



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE) EM
ÁREA RURAL DO CONCELHO DE PALMELA: VARIAÇÃO
SAZONAL E RISCO DE TRANSMISSÃO VETORIAL DE
LEISHMANIA SP.**

Rosa Wanda Jambalina Miguel

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA**

JANEIRO, 2017



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA, PSYCHODIDAE) EM
ÁREA RURAL DO CONCELHO DE PALMELA: VARIAÇÃO
SAZONAL E RISCO DE TRANSMISSÃO VETORIAL DE
LEISHMANIA SP.

Autor: Rosa Wanda Jambalina Miguel

Orientador: Professora Doutora Maria Odete Afonso

Co-orientador: Professora Doutora Carla Maia

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu Avô

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora Professora Doutora Maria Odete Afonso, pela oportunidade e amabilidade com que se prontificou para a orientação deste trabalho, ao longo do qual a transmissão de conhecimentos, a disponibilidade, a motivação e a persistência estiveram sempre presentes. Pela força e encorajamento, especialmente nos momentos mais adversos, em que o seu apoio e carinho foram essenciais para continuar. O meu profundo e sincero obrigado por toda a ajuda prestada.

À minha Co-orientadora Professora Doutora Carla Maia, pela colaboração, disponibilidade, apoio e também pelo conhecimento científico transmitido.

Aos proprietários da quinta, Madalena e Rui, que permitiram a realização das capturas e que colaboraram incansavelmente. Agradeço pela forma como me receberam, oferecendo carinho, afeto e atenção, estando sempre disponíveis para ajudar.

Ao Mestre José Cristóvão pelo apoio prestado na área de Biologia Molecular, pelos conselhos e pela simpatia.

À Doutora Hilda Hernandez pela ajuda prestada, pelas sugestões, pela companhia, pela amizade e por me ter passado um pouco da sua vasta experiência a nível pessoal e profissional, que também contribuíram para o meu crescimento pessoal e académico.

À minha Amiga Adriana Leal, e à minha Colega Stephanie Gouveia por todas as ajudas e sugestões prestadas, no âmbito deste trabalho.

À Câmara Municipal e Biblioteca de Palmela, que colocaram à minha disposição material bibliográfico e pela sua prestabilidade.

À minha família sempre presente ao longo do meu percurso académico, em especial ao meu Tio Frederico e à minha Irmã Ana, pela motivação, incentivo e apoio incondicional.

Pelo apoio, paciência e carinho dos meus amigos que de várias formas contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Em Portugal estão assinaladas cinco espécies flebotomínicas (*Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi* e *Sergentomyia minuta*), sendo *P. perniciosus* e *P. ariasi* as espécies comprovadamente vetoras de *Leishmania infantum*. Ainda que se conheçam os focos de leishmaniose humana e canina, várias são as regiões, ou áreas, em que é desconhecida a fauna flebotomínica, os seus aspetos bioecológicos e vetoriais.

Em 2015, escolheu-se uma região rural, do distrito de Setúbal, concelho e freguesia de Palmela, localidade de Brejos do Assa, como estação flebotomínica, tendo como principal objetivo o estudo da fauna flebotomínica, uma vez que: este distrito é endémico para Leishmaniose humana e canina; a área nunca tinha sido estudada no que diz respeito aos vetores; as condições bioecológicas eram favoráveis à presença de flebotomíneos de diferentes espécies; e apresentava diferentes tipos e variedades de biótopos.

De junho a novembro de 2015, durante duas noites consecutivas por semana, capturaram-se, por armadilhas luminosas CDC (102), 68 flebótomos de ambos os sexos. Para cada biótopo/armadilha colocada, efetuou-se o registo em ficha de campo de todos os parâmetros predefinidos, nomeadamente temperatura, humidade relativa, velocidade do vento, coordenadas, vegetação, animais presentes, registo fotográfico e outros aspetos considerados relevantes. Em relação às fêmeas capturadas, 17,6% (6/34) estavam grávidas e 2,9% (1/34) ingurgitadas. No que diz respeito aos machos, 5,9% (2/34) apresentavam a genitália externa parcialmente rodada. Nenhum dos exemplares apresentou ectoparasitas, como por exemplo ácaros.

A abundância relativa das espécies, identificadas morfológicamente, por ordem decrescente correspondeu a: *Sergentomyia minuta* 64,7% (44/68), *P. perniciosus* 26,5% (18/68), *P. sergenti* 5,9% (4/68) e *P. ariasi* 2,9% (2/68). Quanto à densidade flebotomínica (nº de flebótomos capturados, por armadilha, por noite) foi mais elevada em agosto e setembro, tendo apresentado um ciclo com tendência monofásica.

Não se amplificou DNA de *Leishmania* em nenhuma das 34 amostras de DNA de flebotomíneos fêmeas. A identificação da fonte de alimentação, por PCR, foi realizada em uma fêmea de *P. perniciosus*, que se alimentou em *Gallus gallus*, sendo que a sequência apresentou entre 99 e 100% de homologia para esta espécie.

Uma vez que as espécies comprovadamente vetoras de *L. infantum*, ainda que presentes, apresentaram, neste estudo, baixas abundâncias/densidades e nenhuma fêmea foi encontrada infetada, nesta estação não se verifica elevado risco de transmissão vetorial. Contudo, a presença de *S. minuta* com elevada abundância/densidade, apesar de se terem utilizado armadilhas CDC, não deve ser ignorada uma vez que esta espécie foi já encontrada em vários países, incluindo Portugal, com *Leishmania* e arbovírus humanos.

Por todas as razões acima mencionadas, sugere-se que a monitorização desta, e de todas as áreas propícias à presença de flebótomos, deverá ser realizada e continuada.

Palavras-chave: Flebotomíneos, vetores de *Leishmania* sp., *Sergentomyia minuta*, Brejos do Assa, Setúbal.

ABSTRACT

There are five phlebotomine sand fly species (*Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi* e *Sergentomyia minuta*), registered in Portugal, with *P. perniciosus* and *P. ariasi* being the proven vectors of *Leishmania infantum*. Although several human and canine leishmaniasis foci are known, there are many regions or areas, where the phlebotomine fauna is unknown, as well as their bioecological and vectorial aspects.

In 2015, a rural region of Setúbal's district, Palmela's council and parish, Brejos do Assa local, was selected as a phlebotomine station, in order to study the sand fly species fauna, since: this district is endemic to human and canine leishmaniasis and the vectors responsible for parasite transmission in the area have never been studied; the bioecological conditions and the different variety of biotopes seem to be suitable for the presence of sand flies.

From June to November of 2015, during two consecutive nights per week, 68 phlebotomine sand flies of both genders were captured using CDC light-traps (102). For each biotope/trap placed, the following parameters were registered in the daily data file: temperature, relative humidity, wind speed, coordinates, vegetation, animals visible within a 20 m radius where the CDC was set up, and other aspects found relevant. Six of the 34 (17.6%) of the captured females were pregnant and 2,9% (1/34) were engorged. Two of the 34 (5.9%) males had a partially rotation of the external genitalia. None of the samples presented ectoparasites, like mites for example.

The relative abundance of species, morphologically identified, in decreasing order corresponded to: *Sergentomyia minuta* 64.7% (44/68), *P. perniciosus* 26.5% (18/68), *P. sergenti* 5.9% (4/68) and *P. ariasi* 2.9% (2/68). As far as phlebotomine sand flies density is concerned (number of captured phlebotomine, by trap, by night) it was higher in August and September, showing a monophasic tendency cycle.

Leishmania DNA was not detected by PCR in any of the 34 females. The identification of the food resource, as defined by the analysis of *cyt-b* DNA amplified from the blood-meal detected in the only *P. perniciosus* engorged female showed that it fed on *Gallus gallus*.

The proven vector species of *L. infantum*, although present, have shown, in this study, low abundancy/density and no female was found infected. A high rate of risk of transmission hasn't been verified in this station. Nevertheless, the presence of *S. minuta* with elevated abundancy/density should not be ignored since this species was already found infected with *Leishmania* and human arboviruses in many countries, including Portugal.

For all the reasons mentioned above, on-going monitoring of this and all the areas suitable for the phlebotomine sand fly presence should be performed.

Key-Words: Phlebotomine sand flies, vectors of *Leishmania* sp., *Sergentomyia minuta*, Brejos do Assa, Setúbal.

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÍNDICE GERAL.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	ixx
ÍNDICE DE QUADROS	xxvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmanioses e vetores: aspetos históricos e atuais	1
1.2. Posição sistemática dos flebótomos, ou flebotomíneos	9
1.3. Distribuição geográfica dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) com importância em Medicina humana e veterinária, e transmissão vetorial de agentes patogénicos.....	11
1.4. Morfologia externa dos flebótomos: imagos e formas imaturas	16
1.5. Ciclo de vida e bioecologia dos flebotomíneos.....	19
1.6. O parasita: <i>Leishmania</i> spp.	23
1.6.1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. nos flebótomos vetores.....	24
1.7. Distribuição das leishmanioses em Portugal, espécies flebotomínicas e, eventuais modificações com as alterações climáticas	28
1.8. Principais metodologias utilizadas para a monitorização dos flebótomos, como vetores de <i>Leishmania</i> sp.	32
1.9. Importância do controlo vetorial nas regiões endémicas de Leishmaniose	35
1.10. Objetivos	38

2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1. Distrito de Setúbal, concelho e freguesia de Palmela, localidade de Brejos do Assa: caracterização geral da região estudada	41
2.1.1. Aspetos demográficos, fitogeográficos, faunísticos, climáticos e ambientais.	43
2.2. Captura flebotomínica na estação de Brejos do Assa, Palmela, Setúbal, 2015 ..	46
2.2.1. Consentimento dos proprietários, informações e seleção dos biótopos a prospetar na área de estudo	46
2.2.2. Período de prospeção flebotomínica	47
2.2.2.1. Divisão e caracterização dos vários tipos de biótopos prospetados.....	47
2.2.2.2. Ficha de campo utilizada para as variedades de biótopos prospetados	51
2.2.2.3. Método de captura flebotomínica	52
2.2.2.4. Conservação dos exemplares capturados.....	53
2.2.2.5. Processamento do material capturado para identificação morfológica	54
2.2.3. Identificação morfológica das espécies flebotomínicas capturadas	55
2.2.3.1. Identificação dos flebotomíneos machos.....	55
2.2.3.2. Identificação dos flebotomíneos fêmeas.....	55
2.2.3.3. Determinação do número de fêmeas grávidas	57
2.2.3.4. Determinação do número de fêmeas ingurgitadas	57
2.2.4. Determinação da abundância relativa das espécies flebotomínicas	58
2.2.5. Determinação da densidade flebotomínica por espécie, variação sazonal, de junho a novembro de 2015	58
2.2.6. Determinação da razão dos sexos.....	58
2.2.7. Proporção de fêmeas alimentadas e grávidas	58
2.2.8. Grau da rotação da genitália externa dos machos: total, parcial e sem rotação	59

2.2.9. Taxa de infestação por ectoparasitas	59
2.2.10. Taxa de infeção por endoparasitas não <i>Leishmania</i>	59
2.3. Análise molecular das fêmeas flebotomínicas	59
2.3.1. Extração de DNA a partir de flebótomos	59
2.3.2. Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> sp. através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)	61
2.3.2.1. Amplificação do DNA do cinetoplasto	61
2.3.2.2. Amplificação do DNA ribossomal	62
2.3.2.3. Verificação da amplificação por eletroforese em gel de agarose	64
2.3.3. Análise molecular das refeições sanguíneas	64
2.3.3.1. Amplificação do DNA do gene <i>citocromo b</i>	64
2.3.3.2. Verificação da amplificação por eletroforese em gel de agarose	65
2.3.3.3. Sequenciação e análise dos segmentos de DNA	65
2.3.4. Determinação da taxa de infeção das espécies flebotomínicas por <i>Leishmania</i> sp.	66
2.3.5. Determinação da proporção das diferentes fontes sanguíneas das fêmeas flebotomínicas capturadas	66
2.4. Análise estatística dos dados obtidos	66
3. RESULTADOS	67
3.1. Espécies flebotomínicas, de ambos os sexos, capturadas e identificadas morfológicamente	67
3.1.1. Abundância relativa das espécies flebotomínicas, de ambos os sexos, capturadas em Brejos de Assa, Palmela, Setúbal, de junho a novembro de 2015. ...	69
3.1.2. Fêmeas grávidas e fêmeas ingurgitadas, por espécie	69
3.1.3. Razão dos sexos por espécies flebotomínicas	71

3.1.4. Grau da rotação da genitália externa dos machos: total, parcial e sem rotação	71
3.1.5. Taxas de infestação por ectoparasitas e por endoparasitas não <i>Leishmania</i> sp.	72
3.2. Distribuição das espécies flebotomínicas capturadas, por tipo e variedade de biótopos prospetados, de junho a novembro de 2015, Brejos do Assa	72
3.3. Biótopos domésticos e peridomésticos: presença / ausência flebotomínica, Brejos do Assa, junho a novembro de 2015	73
3.4. Diversidade e densidade flebotomínica, por tipo e variedade de biótopos prospetados.....	74
3.5. Densidade flebotomínica por espécie e por meses de captura	76
3.6. Variação sazonal das espécies flebotomínicas de junho a novembro de 2015 ...	77
3.6.1. Densidade de <i>Sergentomyia minuta</i> , por sexo e total, de junho a novembro de 2015	78
3.7. Deteção molecular de <i>Leishmania</i> sp. em flebotomíneos, capturados em Brejos do Assa, Palmela, Setúbal, 2015	79
3.8. Identificação molecular das refeições sanguíneas de flebotomíneos, capturados em Brejos do Assa, Palmela, Setúbal, 2015	80
3.9. Análise estatística.....	80
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	83
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
6. ANEXOS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Distribuição mundial da LV, 2013 (Adaptado de OMS, 2016)	3
Figura 1.2: Distribuição mundial da LC, 2013 (Adaptado de OMS, 2016)	4
Figura 1.3: Esplenomegalia, assinalada com um círculo, num paciente etíope com LV (Adaptado de Boleart & Sundar, 2014)	5
Figura 1.4: LCL, causada por <i>L. infantum</i> (A) e (B); LCD, causada por <i>L. aethiopica</i> (C); Paciente da Etiópia com múltiplas lesões no joelho (D) (Adaptado de Boelaert & Sundar., 2014; Mansueto et al., 2014)	7
Figura 1.5: Distribuição dos principais vetores de flebovírus na Europa. (A) <i>P. papatasi</i> , (B) <i>P. perfliewi</i> , (C) <i>P. perniciosus</i> (Adaptado de Alkan et al., 2013).....	15
Figura 1.6: Flebotomíneo fêmea ingurgitada, após refeição sanguínea completa (Adaptado de Clementi et al., 2016).....	17
Figura 1.7: Posição de repouso de flebótomo, com as asas abertas em V. À esquerda – genitália externa de um macho; à direita – assinaldos, com um círculo, os últimos segmentos abdominais de uma fêmea (Adaptado de Beran, 2010).....	17
Figura 1.8: Ciclo de vida dos flebótomos: ovos, larvas, pupas e imagos - macho e fêmea (adaptado de Amaro, 2014).....	20
Figura 1.9: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp; (A) inseto vetor flebotomínico; (B) hospedeiros vertebrados e (C1) e (C2) formas amastigotas e promastigotas do parasita, respetivamente (Adaptado de Beran, 2010).....	24
Figura 1.10: Ciclo de vida intravetorial de <i>Leishmania</i> sp.: formas procíclicas, nectomonas, leptomonas, hatomonas e metacíclicas infetantes (Adaptado de Kamhawi, 2006; Afonso & Alves-Pires, 2008).	27

Figura 1.11: Seroprevalência da Lcan em Portugal: assinalado, a azul, a seroprevalência no distrito de Setúbal – área de estudo flebotomínico deste trabalho (Adaptado de http://www.onleish.org/index.php , acedido a 13 de Agosto de 2016.....	29
Figura 2.1: Mapa de Portugal com a localização do distrito de Setúbal e respetivos concelhos. O concelho de Palmela encontra-se assinalado (Fonte: Anuário Estatístico de Palmela, 2013).....	41
Figura 2.2: Mapa do concelho de Palmela, assinaladas a freguesia de Palmela e a localidade de Brejos do Assa, que corresponde especificamente à região de estudo – estação flebotomínica (38° 34' 6''N-8° 50'16''W) (Fonte: Anuário Estatístico de Palmela, 2013).....	42
Figura 2.3: Diferentes aspetos da estação flebotomínica rural, Brejos do Assa, 2015 (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	46
Figura 2.4: Biótopo doméstico, variedade - Casa exterior: janela/jardim da habitação. Na figura B está assinalada uma armadilha CDC (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)	48
Figura 2.5: Biótopo doméstico: depósito de lenha (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	48
Figura 2.6: Biótopo doméstico: arrecadação interior (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)	49
Figura 2.7: Biótopos peridomésticos: abrigos mistos (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)	50
Figura 2.8: Biótopo peridomésticos: reservatório de água (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	50
Figura 2.9: Biótopo peridoméstico: árvores de fruto, nespereira e macieira (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	51
Figura 2.10: Aspetos da armadilha luminosa miniaturizada do tipo CDC (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	53
Figura 2.11: Separação dos flebotomíneos capturados, por sexo (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	54

Figura 2.12: Identificação das espécies de flebotomíneos fêmeas ao estereomicroscópio e ao microscópio ótico (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	56
Figura 2.13: Registo fotográfico das espermatecas das fêmeas, por microscopia óptica, obtido durante a identificação das espécies (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	57
Figura 2.14: Material e Kit utilizado para a extração de DNA, a partir de flebótomos fêmeas. A- Kit; B- Banho-maria; C- Placa térmica; D- Centrífuga; E- Estufa (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	61
Figura 2.15: Representação esquemática do espaço interno transcrito 1 (ITS-1) no operão ribossomal amplificado com <i>primers</i> específicos de <i>Leishmania</i> . <i>Primers</i> : LITSR (5'TGATACCACTTATCGCACTT-3') e L5.8S: (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'). SSU= pequena unidade do gene rRNA, LSU= grande subunidade do gene rRNA.....	63
Figura 3.1: Espermateca de <i>Phlebotomus perniciosus</i> observada por microscopia ótica (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	67
Figura 3.2: Espermateca de <i>Sergentomyia minuta</i> observada por microscopia ótica (Fotografia de autor)	68
Figura 3.3: Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas de junho a novembro de 2015, Brejos do Assa, Palmela, Setúbal.	69
Figura 3.4: Galinheiro, junto a um lago, associado ao abrigo de pavões/interior, onde se capturaram cinco <i>S. minuta</i> grávidas e uma fêmea de <i>P. perniciosus</i> ingurgitada, Brejos do Assa (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	70
Figura 3.5: Galinheiro associado a curral de cabras, onde se capturou uma fêmea grávida de <i>P. perniciosus</i> , Brejos do Assa. Assinalada a armadilha CDC (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	70

Figura 3.6: Galinheiro associado a coelheira/externo (A e B), onde se capturou um flebótomo macho <i>P. perniciosus</i> com a genitália externa parcialmente rodada, Brejos do Assa, Palmela, Setúbal (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	71
Figura 3.7: Presença e ausência flebotomínica (%) nos biótopos domésticos e peridoméstico, Brejos do Assa, junho a novembro de 2015	74
Figura 3.8: Parede exterior da casa (janela), onde se capturou um macho de <i>P. sergenti</i> com a genitália externa parcialmente rodada, Brejos do Assa, junho de 2015. Armadilha CDC assinalada (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).....	75
Figura 3.9: Densidade flebotomínica por tipo e variedade de biótopos, junho a novembro de 2015, Brejos do Assa, Palmela, Setúbal	75
Figura 3.10: Densidade flebotomínica por espécies e total, de junho a novembro de 2015, em Brejos do Assa, Palmela, Setúbal.....	77
Figura 3.11: Densidade de <i>S. minuta</i> , de ambos os sexos e total, de junho a novembro de 2015, Brejos do Assa, Palmela, Setúbal.....	78
Figura 3.12: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com as sequências iniciadoras (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)	79

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1: Posição sistemática dos flebótomos, ou flebotomíneos.....	10
Quadro 2.1: Área, número de habitantes e densidade populacional do distrito e península de Setúbal, concelho e freguesia de Palmela (adaptado de INE, 2011).....	43
Quadro 3.1: Número e espécies de flebotomíneos, de ambos os sexos, capturados em Brejos do Assa, de junho a novembro de 2015.....	68
Quadro 3.2: Tipos e variedades de biótopos prospectados (A-P) na estação de Brejos do Assa, espécies flebotomínicas e total de exemplares, de ambos os sexos, capturados, de junho a novembro de 2015.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

% – Percentagem

°C – Graus Celsius

A.C – Antes de Cristo

CDC – *Centers for Diseases Control and Prevetion*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTNs – Doenças tropicais negligenciadas

GAML – Grande Área Metropolitana de Lisboa

GPS – *Global Positioning System*

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

INE – Instituto Nacional de Estatística

i.e – Por outras palavras (do latim *id est*)

LC – Leishmaniose cutânea

LCan – Leishmaniose canina

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LCL – Leishmaniose cutânea localizada

LCPK – Leishmaniose cutânea pós kala-azar

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LV – Leishmaniose visceral

ml – Mililitro (s) = 10^{-3} litro

mm – Milímetro (s) = 10^{-3} metro

Nº – Número

NUTS II – Nível II da Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos

NUTS III – Nível III da Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONLeish – Observatório Nacional das Leishmanioses

pb – Pares de bases

PBS – Solução de soro fisiológico tamponada com fosfatos, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*

PCR – Reação em cadeia da polimerase de DNA, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PCR-RFLP - PCR, seguida de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

PNA – Parque Natural da Arrábida

RNES – Reserva Natural do Estuário do Sado

RNET – Reserva Natural do Estuário do Tejo

s.l. – *Sensu lato*

SPG – Gel secretório promastigota do inglês *Secretory Promastigote Gel*

UEI – Unidade de Ensino e Investigação

UNL – Universidade Nova de Lisboa

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses e vetores: aspetos históricos e atuais

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas transmitidas por insetos vetores da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (flebotomíneos), género *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840, no Velho Mundo, e género *Lutzomyia* França, 1924, no Novo Mundo. Estas parasitoses são causadas por várias espécies pertencentes ao género *Leishmania* Ross, 1903, e apresentam uma notória diversidade epidemiológica e clínica (Campino & Abranches, 2002; Akhoundi et al., 2016).

O conjunto das referidas doenças parasitárias afeta os seres humanos, que podem ser reservatórios ou hospedeiros acidentais, os animais domésticos e os silváticos, apresenta uma ampla distribuição geográfica, e encontra-se em todos os continentes exceto na Antártida. Assim, as leishmanioses são muito importantes a nível mundial, quer em medicina humana, quer em medicina veterinária (Desjeux, 1992; OMS, 2010).

Das cerca de 30 espécies de *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) descritas, cerca de 20 estão associadas a diversas manifestações clínicas nos humanos (Cupolillo et al., 2014). Até à data, mais de 900 espécies de flebotomíneos foram identificados, mas apenas cerca de 98 espécies foram comprovadas ou incriminadas como vetoras de *Leishmania* (Maroli et al., 2013). Existe uma relação específica entre os vetores flebotomínicos e as espécies de *Leishmania*, de tal modo que, na Natureza, apenas algumas espécies de flebótomos têm a capacidade de transmitir certas espécies de *Leishmania* e daí ocorrer um determinado tipo de doença (Ramalho-Ortigão et al., 2010; Bates, 2007).

Segundo Akhoundi et al. (2016), a longa História das leishmanioses, data de 2.500 A.C. com várias descrições encontradas em escritos antigos e, presentemente, com achados moleculares de material arqueológico. Foram vários os aspetos marcantes da História desta doença, destacando-se inicialmente, em meados do século XIX, no ano de 1898, a primeira descrição do protozoário, por Borovsky, do agente causador do “boto-do-oriental”. Em 1901, na Índia, William Boog Leishman (1865-1926), descobriu em esfregaços de baço de um soldado britânico, que padecia de acessos febris, anemia,

atrofia muscular e esplenomegalia, e que morrera de “Kala-azar”, que significa “febre-negra” e era utilizado pelos médicos indianos para designar a leishmaniose visceral (LV) no Homem, corpos ovóides dentro de macrófagos aos quais, anos mais tarde foi dado o nome de *Leishmania*. Cerca de três anos depois, Charles Donovan (1863-1951) reconheceu os mesmos organismos e sintomas descritos noutros pacientes com Kala-azar e publicou as suas descobertas. Ronald Ross, ao descobrir a relação entre estes organismos e o Kala-azar propôs a criação do género *Leishmania*.

Em 1904, Rogers conseguiu cultivar o parasita, demonstrando que a forma flagelada desenvolvia-se em cultura. Paton, em 1907, verificou que as formas amastigotas podiam ser encontradas no sangue de doentes com Kala-azar e as formas promastigotas existiam no aparelho digestivo de insetos que se alimentavam no sangue destes doentes. Ao longo do século XX, até à presente data, foram várias as descrições, efetuadas por diversos investigadores, relativas à classificação das espécies e evolução da patologia. Contudo, atualmente existe, ainda, alguma discordância na classificação das espécies do referido parasita.

A par da História das leishmanioses como doenças infecciosas, e da classificação do parasita, as primeiras referências aos flebótomos, como vetores de *Leishmania*, foram efetuadas em 1904, na Argélia, pelos irmãos Sergent e, mais tarde, em 1913, por Mackie, na Índia (Akhoundi et al., 2016). No cão, o parasita foi identificado pela primeira vez na Tunísia, em 1908, por Charles Nicolle e Comte. Posteriormente, consoante a espécie do parasita, o cão foi considerado reservatório, como por exemplo de *L. infantum*. Em relação ao gato, como eventual reservatório, as primeiras referências à leishmaniose felina surgiram nos textos de parasitologia de Neveu-Lemaire, em 1942, e posteriormente foram descritos casos no Egipto, no Texas e também em Portugal (Barnes et al., 1993; Costa-Durão et al., 1994) .

No que diz respeito à epidemiologia das leishmanioses, estas são doenças parasitárias consideradas negligenciadas, sendo a parasitose, a seguir à malária, com maior prevalência a nível mundial (OMS, 2010). As leishmanioses constituem um grave problema de saúde pública e animal, principalmente nos países em desenvolvimento, visto serem negligenciadas ao nível da vigilância e do controlo sanitário. Estas parasitoses são endémicas em mais de 98 países, nos quais mais de 350 milhões de pessoas estão

em risco de contrair a(s) doença(s) (OMS, 2010; Alvar et al., 2012). Afetam, em especial, as populações mais pobres e vulneráveis do mundo, encontrando-se na maioria dos casos associadas a condições de malnutrição, imunossupressão, migrações, situações precárias de habitação e falta de recursos socioeconômicos.

Podem ser diversas as manifestações clínicas da infecção por *Leishmania* em seres humanos (OMS, 2010), resultando principalmente em três principais formas: LV, leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2010) existem cerca de 12 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo. Estima-se que, por ano, ocorrem cerca de 2 milhões de novos casos e destes, aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões correspondem a LV e 0,7 a 1,3 milhões a LC. O número de mortes provocadas por estas parasitoses variam entre 20 000 a 40 000 por ano (Alvar et al., 2012; Ejov & Dagne, 2014; OMS, 2015, 2016a).

Nas regiões onde as leishmanioses são endêmicas (Figura 1.1 e Figura 1.2), existe uma grande diferença entre o número de casos que ocorrem na realidade e o número de casos reportados oficialmente.

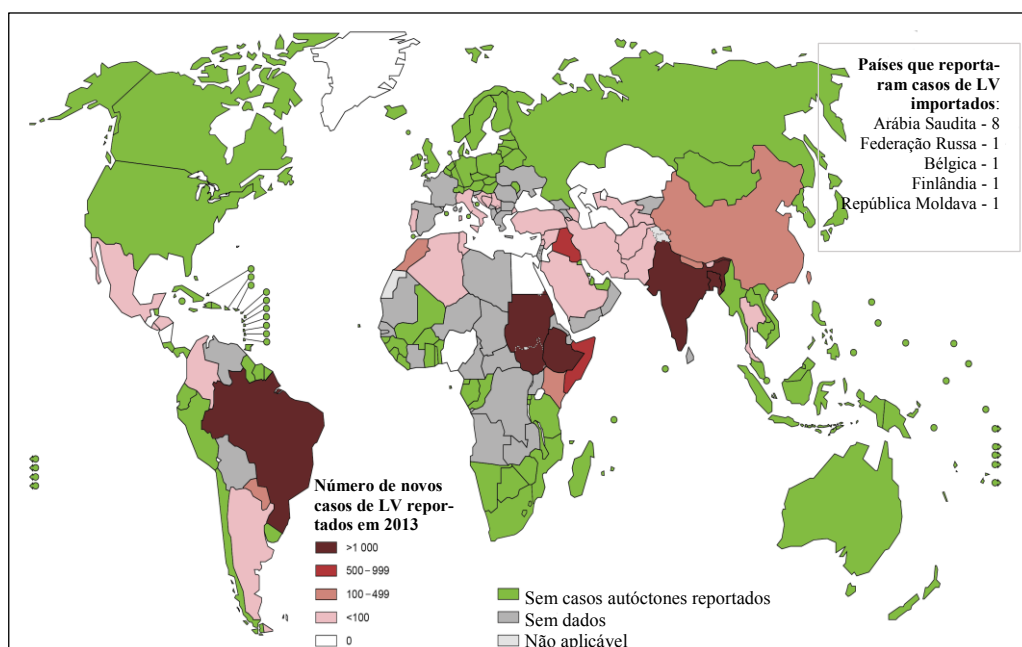


Figura 1.1: Distribuição mundial da LV, 2013 (Adaptado de OMS, 2016)

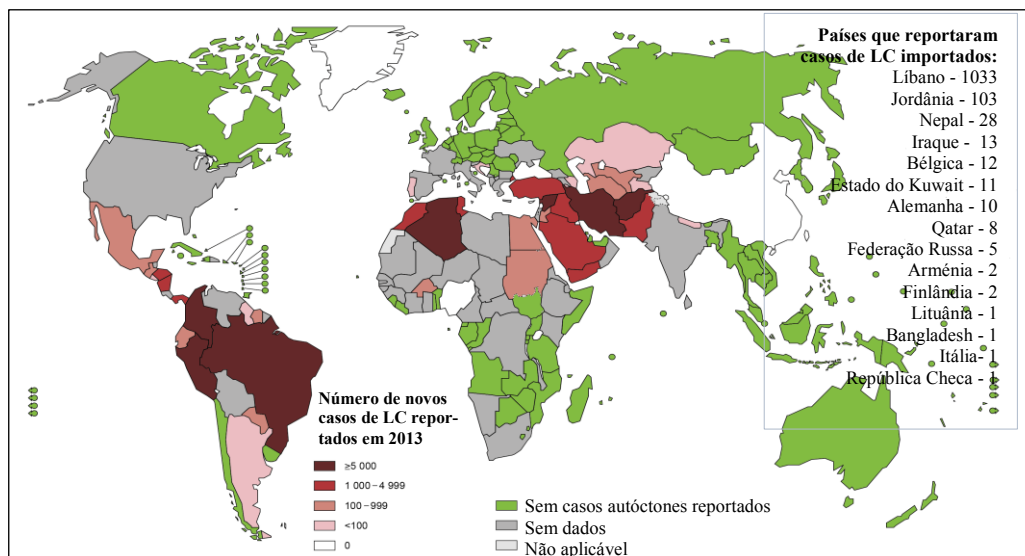


Figura 1.2: Distribuição mundial da LC, 2013 (Adaptado de OMS, 2016)

A diferença entre os casos reais e os reportados deve-se especialmente aos seguintes fatores: a doença nem sempre é de notificação obrigatória; e mesmo nos países em que o é, nem sempre a doença é declarada oficialmente, havendo sub-notificação da mesma (Desjeux, 2004); casos de doença não ou mal diagnosticados, e consequentemente não declarados, que ocorrem especialmente quando os indivíduos não têm acesso a cuidados médicos, e as capacidades de diagnóstico são escassas ou inexistentes; e a distribuição dos locais de transmissão ser muitas vezes descontínua com focos separados, amplamente dispersos.

Assim, a verdadeira situação epidemiológica das leishmanioses é desconhecida devido à subnotificação das doenças, falta de sistemas de vigilância epidemiológica e/ou métodos de diagnóstico adequados, e com a maioria dos dados de incidência disponíveis baseados em estimativas (Pace, 2014). Deste modo, apesar da escassez de dados fiáveis, não há dúvida de que o número de casos que ocorrem em todo o mundo é consideravelmente maior do que o reportado oficialmente. Em alguns locais, os casos têm sido relatados como localmente transmitidos sem a presença de espécies de vetoras comprovadas, o que poderá indicar um falso positivo (Pigott et al., 2014), ou não realização de estudos flebotômicos nesses locais.

Melhores sistemas de vigilância são urgentemente necessários, nomeadamente nas áreas com maiores incidências, em particular em focos da doença, em que o contro-

lo deve ser mais intensivo no sentido da diminuição da parasitose e da transmissão vetorial (Alvar et al., 2012).

A epidemiologia das leishmanioses depende das características das espécies dos parasitas, das espécies vetoras, das características bioecológicas dos locais de transmissão, da exposição das populações humanas ao parasita e ao vetor, e do comportamento humano. A transmissão natural da doença dá-se quando um flebotomíneo fêmea infectante, inocula as formas promastigotas metacíclicas do parasita *Leishmania* sp. num hospedeiro vertebrado, reservatório ou acidental.

A LV ou Kala-azar é a forma sistémica da doença, afetando a medula óssea, baço e fígado, uma vez que os parasitas invadem as células do sistema fagocítico-mononuclear destes órgãos. Apresenta um período de incubação de 1 a 36 semanas, e a manifestação clínica é geralmente associada a acessos febris, palidez, dor abdominal, anorexia, diarreia e linfadenopatia. Os sinais clínicos principais são hepatoesplenomegalia (Figura 1.3) e hemorragias orais, nasais e intestinais, em situações mais severas da doença. Esta forma de doença evolui de forma progressiva, podendo ser fatal em 95% dos casos se não for tratada. Encontra-se em 54 países e mais de 90% dos casos ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. *L. infantum* é o agente causal de LV (também de LC) no Velho Mundo (i.e. Norte de África, Bacia Mediterrânica, Ásia Central e Noroeste da China) e no Novo Mundo (América Central e do Sul), e os cães são o principal reservatório, apesar de existirem algumas descrições em que a infeção ocorre em roedores, lobos (Millán et al., 2014) e raposas (Abranches et al., 1983). A espécie *L. donovani* é responsável pela LV apenas no Velho Mundo (Alvar et al., 2012, Pigott et al., 2014) estando presente na Índia, Paquistão, Oeste da China, Sudão, Somália, Etiópia e Quênia, e a sua transmissão é essencialmente antropológica (Ready, 2013).



Figura 1.3: Esplenomegalia, assinalada com um círculo, num paciente etíope com LV (Adaptado de Boleart & Sundar, 2014)

A LC encontra-se amplamente distribuída por todo o mundo e os dez principais países com a maior estimativa de casos são o Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irão, Síria, Etiópia, Norte do Sudão, Costa Rica e Perú, e juntos contam com mais de 70 a 75% da incidência global de LC (Alvar et al., 2012).

No Velho Mundo, *L. major* é o principal agente etiológico responsável pela LC no Norte de África, Médio Oriente, Península Arábica, Quênia, Sudão e Índia, apresentando uma transmissão zoonótica, principalmente através de hospedeiros roedores (Maroli et al., 2013). *L. tropica* é também agente de LC, fundamentalmente em áreas urbanas e é restrita a humanos. Encontra-se na Grécia, Sérvia, Roménia, Turquia, Afeganistão, Norte de África, Médio Oriente e algumas regiões da Ásia Ocidental. *L. aethiopica* encontra-se na Etiópia, Quênia e Uganda, causando leishmaniose cutânea difusa (LCD) e os principais reservatórios são os roedores. No Norte de África, onde *L. major* e *L. tropica* são responsáveis por LC, também alguns isolados de lesões cutâneas foram igualmente identificados com *L. infantum*. A LC é maioritariamente causada pelos zimodemes MON-11, MON-29, MON-33, MON-78 e MON-111 (Gradoni & Gramiccia, 1994; Campino & Abranches, 2002).

No Novo Mundo, a LC pode ser causada por *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. lainsoni* (Maroli et al, 2013). As espécies de *Leishmania* no Novo Mundo, na sua generalidade, são transmitidas por espécies flebotomínicas do género *Lutzomyia* e possuem como reservatórios principais, uma grande variedade de animais domésticos e silváticos (Schubach & Conceição-Silva, 2014).

Na maioria dos casos, a LC tem cura espontânea sem intervenção clínica, embora a gravidade da doença e evolução no tempo para a cura possam variar, dependendo da espécie do parasita infetante e da natureza da resposta imunológica do indivíduo. A LC apresenta-se sob duas formas principais: a leishmaniose cutânea localizada (LCL) e a LCD (Figura 1.4).

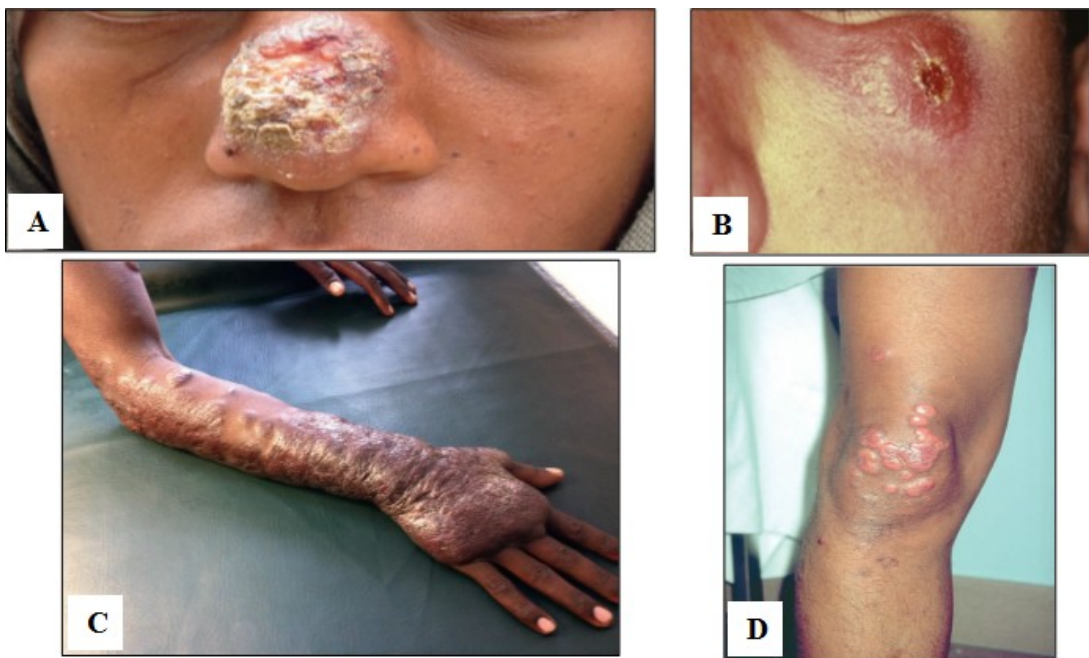


Figura 1.4: LCL, causada por *L. infantum* (A) e (B); LCD, causada por *L. aethiopica* (C); Paciente da Etiópia com múltiplas lesões no joelho (D) (Adaptado de Boelaert & Sundar., 2014; Mansueto et al., 2014)

A forma mais frequente de LC no Velho Mundo é a forma localizada, também conhecida por Botão do Oriente (Campino & Abranches, 2002). Pode apresentar-se clinicamente sob a forma de úlceras, nódulos, ou lesões pápula-tuberosas, e linfáticas, ou seja, lesões limitadas, sem envolvimento visceral ou das mucosas (Amer & Amer 2014; Campino & Abranches, 2002). As lesões são geralmente indolores, mas tornam-se dolorosas se ocorrer uma reinfeção (Amer & Amer 2014). Normalmente, as lesões ocorrem nas partes expostas da superfície do corpo acessíveis às picadas dos flebótomos, principalmente na face, mãos, antebraços e membros inferiores.

A maioria das lesões desenvolve-se após algumas semanas depois da picada do flebótomo, mas também pode ocorrer vários meses depois. Na maior parte dos casos, estas lesões atingem mais as crianças como acontece com *L. tropica* e *L. infantum*. Em situações de epidemia, a doença tende a ser mais grave, com lesões múltiplas que podem provocar despigmentação da pele e cicatrizes desfigurantes (Campino & Abranches, 2002).

A LCD é uma forma rara e de cura difícil, sendo caracterizada por uma não ulceração das lesões iniciais, mas após algum tempo, que pode variar de meses a anos, dissemina-se através da corrente sanguínea para outros locais da pele, produzindo nódulos isolados. Esta forma da doença progride ao longo de anos, sendo rara a cura espontânea. O quadro clínico da LCD, também conhecido por anérgico, é caracterizado por uma distribuição difusa de pápulas, nódulos e lesões tuberosas, que afetam a face e os membros, não atingindo o tronco (Amer & Amer 2014).

A leishmaniose mucocutânea (LMC), também designada por Espúndia, encontra-se na América Central e do Sul, sendo que aproximadamente 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru. É a forma de LC mais agressiva, causada por *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e, ocasionalmente, por *L. panamensis* e *L. peruviana*. *L. braziliensis* é o principal agente causal de LMC na América Central e na América do Sul. É uma zoonose cujos reservatórios naturais são pequenos roedores silváticos, preguiças e cavalos. Esta forma desenvolve-se em duas fases: uma lesão cutânea primária semelhante à LC, eventualmente seguida, após um período variável de latência, pelo envolvimento das mucosas secundárias. As lesões clínicas de LMC são caracterizadas por ulcerações e lesões infiltradas nas mucosas, oral, nasal e tecidos adjacentes, levando à sua metastização com destruição parcial ou total. As mucosas genitais e oculares são raramente afetadas (Desjeux, 2004; Amer & Amer 2014).

A leishmaniose cutânea pós-kala-azar (LCPK) surge cerca de seis meses a um ano depois do Kala-azar ter sido aparentemente curado, mas pode ocorrer mais cedo, caracterizando-se por uma mácula, pápula ou nódulo usualmente na face, ou em outras partes do corpo. Ocorre principalmente na África Oriental (até 50%) e no subcontinente Indiano (5-10%). As pessoas com LCPK são consideradas como sendo uma potencial fonte da infecção de *L. donovani* (OMS, 2016).

A LMC, e as formas mais graves de LC, constituem uma parasitose com impacto socioeconómico negativo, em populações subdesenvolvidas, causando graves sequelas físicas e psicológicas resultando, na maioria das vezes, no afastamento dos indivíduos infetados da sociedade local (Desjeux, 2004).

Na Europa, Israel, Turquia, Turquemenistão e Uzbequistão são, até à presente data, os países/regiões mais afetados pelas três principais formas da leishmaniose (LC,

LV e LMC), contando com quase 80% do total dos casos reportados na Região Europeia. Os Balcãs, o Sul do Cáucaso e a Ásia Central também são bastante afetados. Nessas regiões, a doença é causada por *L. major*, *L. tropica* e *L. infantum*. Os principais vetores da LC na Europa são *Phlebotomus sergenti* e *P. papatasi* (OMS, 2016a).

O aumento das leishmanioses poder-se-á verificar por uma multiplicidade de fatores, entre os quais destacam-se as alterações climáticas e as modificações ambientais, o aumento da densidade e atividade flebotomínica, as condições socio-económicas, o ecoturismo não controlado, o abandono de cães, as migrações, a deslocação de populações rurais para áreas suburbanas/urbanas e outros aspetos que poderão contribuir para o aumento destas parasitoses ainda negligenciadas (Santos & Miranda, 2006).

1.2. Posição sistemática dos flebótomos, ou flebotomíneos

Os flebótomos, ou flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), do grego *phlebos* (veia) + *tomos* (cortar), insetos vetores naturais de *Leishmania*, são ainda frequentemente confundidos com mosquitos (Culicídeos). Apesar destas duas famílias de insetos serem responsáveis pela transmissão de vários agentes patogénicos através da picada, são muito distintos, não só no que diz respeito aos aspetos taxonómicos, morfológico e biológico, mas também no que diz respeito aos microrganismos transmitidos (Killick-Kendrick, 1999, Maroli et al., 2013).

Atualmente, estima-se que na Natureza existam mais de 900 espécies de flebótomos distribuídas por diferentes regiões do mundo (Ready et al., 2013; Akhoundi et al., 2016), tal como acima foi referido. Os flebotomíneos, pertencem à Ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Quadro 1.1).

Quadro 1.1: Posição sistemática dos flebótomos, ou flebotomíneos

Posição Sistemática	
Filo	Arthropoda
Subfilo	Hexapoda
Classe	Insecta
Subclasse	Pterygota
Superordem	Endopterygota
Ordem	Diptera
Subordem	Nematocera
Infraordem	Psychodomorpha
Família	Psychodidae
Subfamília	Phlebotominae
Gêneros	<i>Phlebotomus</i> ; <i>Sergentomyia</i> ; <i>Lutzomyia</i> e <i>Variae</i>

A classificação taxonômica dos flebotomíneos (Gêneros, Subgêneros e Espécies) não é ainda consensual nem definitiva.

Presentemente, o gênero *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840, inclui 13 subgêneros, nomeadamente *Adlerius*, *Anaphlebotomus*, *Australophlebotomus*, *Euphlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Kasauliuls*, *Larroussius*, *Madaphlebotomus*, *Paraphlebotomus*, *Phlebotomus*, *Spelaeophlebotomus*, *Synphlebotomus* e *Transphlebotomus* (Akhoundi et al., 2016). O gênero *Sergentomyia* França & Parrot, 1920, está dividido em 10 subgêneros: *Capensomyia*, *Grassomyia*, *Neophlebotomus*, *Parrotomyia*, *Parvidens*, *Rondonomyia*, *Sergentomyia*, *Sintonius*, *Spelaeomyia* e *Vattieromyia*.

Os flebótomos do Novo Mundo incluem três principais gêneros: *Lutzomyia*, *Warileya* e *Brumptomyia*, que se encontram nas regiões Neártica e Neotropical. O gênero *Lutzomyia* França, 1924, inclui cerca de 434 espécies e vários subgêneros, incluindo *Coromyia* (grupo *Delpozoi*), *Dampfomyia* (grupo *Saulensis*), *Evandromyia*, *Helcocyrtomyia*, *Lutzomyia*, *Micropygomyia* (grupos *Pilosa* e *Oswaldoi*), *Nyssomyia*, *Pintomyia*, *Pressatia* (grupo *Baityi*), *Psathyromyia* (grupos *Aragaoi*, *Dreisbachi* e *Lanei*),

Psychodopygus, *Sciopemyia* (grupos *Migonei* e *Verrucarum*), *Trichophoromyia*, *Trichopygomyia* e *Viannamyia* (grupo *Rupicola*), bem como algumas espécies ainda desagrupadas.

A classificação flebotomínica em seis géneros foi aceite durante vários anos e só recentemente, com os trabalhos de Rispail & Léger (1998) e Léger & Depaquit (2001), para as espécies do Velho Mundo, e de Galati (1995; 2003), para as espécies do Novo Mundo, a classificação da Subfamília Phlebotominae foi revista e definidos 34 géneros: 10 no Velho Mundo, 22 no Novo Mundo, e 2 géneros extintos (Maroli et al., 2013; Bates et al., 2015).

A sistemática dos flebótomos é complexa e tem sido continuamente sujeita a revisões, que incluem a adição de novas espécies e a modificação e/ou remoção de outras. À medida que se desenvolvem novos métodos moleculares, aliados aos métodos biométricos, quando aplicados à identificação de espécies de flebótomos, será possível obter uma maior objetividade na organização taxonómica das espécies, o que pode levar a alterações nas suas classificações atuais e auxiliar na informação biomédica, no controlo de vetores, bem como nos estudos evolutivos sobre a relação vetor-parasita (Bates et al., 2015). A correta identificação das espécies envolvidas na transmissão de agentes patogénicos é fundamental para a elaboração de estratégias para o controlo vetorial (Shimabukuro et al., 2011).

1.3. Distribuição geográfica dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) com importância em Medicina humana e veterinária, e transmissão vetorial de agentes patogénicos

Encontrando-se na Natureza há cerca de 110 milhões de anos, a distribuição dos flebótomos estende-se desde os 50° de latitude Norte aos 40° de latitude Sul, estando ausentes na Nova Zelândia e nas ilhas do Pacífico. Quanto à distribuição altitudinal, esta varia desde os 300 metros abaixo do nível do mar, Mar Morto (Lane, 1993) e os 3600 m acima do nível do mar, no Mashad, Irão (Akhoundi et al., 2016).

A distribuição geográfica das espécies atualmente conhecidas, no Velho Mundo e Novo Mundo, abrange as seguintes regiões: Paleártica, Afrotropical, Oriental, Neotropical, Neártica e Australiana. A distribuição não é contínua, sendo focal, e estando condicionada pelo tipo de vegetação, clima, composição dos solos e hospedeiros vertebrados preferenciais (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Apesar de ocorrerem numa enorme variedade de habitats, a distribuição dos flebótomos pode ser limitada por temperaturas e humidade relativa extremas. A ocorrência dos imagos verifica-se em áreas com temperaturas médias acima dos 15,6°C. Em habitats áridos e semi-áridos, as populações de flebótomos são abundantes no final da estação das chuvas e menores no final da estação seca. Nos desertos quentes e secos ou em climas secos temperados com verões quentes e invernos frios (exemplo Sul da Europa), os adultos de algumas espécies podem desaparecer por completo durante as estações mais secas ou mais frias do ano.

Os flebótomos presentes no Velho Mundo incluem três principais géneros: *Phlebotomus*, Rondani & Berté, 1840, *Sergentomyia* França & Parrot, 1920 e *Chinius* Leng, 1987 e, consoante estes géneros, são encontrados no Irão, Paquistão, antiga União Soviética U.S.S.R, França, Turquia, Marrocos, Yemen, Espanha, Portugal, Tunísia, Afeganistão, Arábia Saudita, Iraque, Argélia, Egipto, Grécia, China e Jordânia (Akhoundi et al., 2016).

Em áreas tropicais, apenas algumas espécies de *Phlebotomus* estão presentes, tais como na África sub-saariana, sudeste da Ásia, ou região do Pacífico. Este género inclui muitas espécies que se alimentam de sangue humano e algumas são endofágicas e/ou endófilas. Assim, apresentando estas características poderão ser consideradas bons vetores.

As espécies do género *Sergentomyia* França & Parrot, 1920, comuns no Velho Mundo, são dominantes em áreas tropicais. A sua distribuição compreende as regiões Afrotropical, Oriental, Australásia, sub-região Indiana, África Sub-sariana e Ásia, ainda que também ocorram no continente Europeu. A maioria das espécies alimentam-se principalmente em animais de sangue frio (répteis) (Lewis, 1975).

O género *Chinius* Leng, 1987 inclui quatro espécies conhecidas: *Chinius junliensis*, *C. barbazani*, *C. eunicegalatae* e *C. samarensis* que podem ser encontradas em

cavernas ou grutas nas regiões montanhosas. Estas espécies foram encontradas respetivamente na China, Tailândia, Laos e Filipinas (Léger et al., 2010; 2012; Depaquit et al., 2006).

Lutzomyia é o género mais importante em termos de diversidade de espécies e de importância médica, apresentando uma ampla área de dispersão, sendo encontrada apenas no Novo Mundo. Os flebótomos deste género encontram-se desde áreas urbanas até áreas florestais da América do Sul e Central (Young & Duncan, 1994; Akhoundi et al., 2016). A classificação das espécies do género *Lutzomyia* permanece, em grande parte, não resolvida e baseia-se em caracteres morfológicos taxonómicos que ainda são controversos.

O género *Warileya* Hertig, 1948 inclui seis espécies, que são encontradas na região Neotropical. O género *Brumptomyia* Franca & Parrot, 1921 compreende cerca de 24 espécies, que são amplamente distribuídas na América do Sul e Central. As espécies deste género constituem um grupo de flebotomíneos associados a tocas de tatus e, por vezes, a troncos de árvores. Até à data desconhece-se a eventual alimentação em seres humanos.

A distribuição flebotomínica pode sofrer uma expansão devido às alterações climáticas, o que significa que a distribuição dos agentes etiológicos a eles associados poderá vir também a expandir-se num futuro próximo (Gargaté, 2014).

No final deste século (XXI), e através de modelos climáticos, sugere-se que o número de dias quentes na Europa Central será idêntico ao que se verifica atualmente no Sul da Europa. Espera-se, também, que a precipitação, na estação quente, aumente nas regiões do Nordeste da Europa, e diminua no Sul (Beniston et al., 2007). Assim, as espécies flebotomínicas poderão sofrer uma expansão ou retração, dependendo das suas características e perfis bioclimáticos.

Os flebótomos para além de serem os únicos vetores de *Leishmania* são também responsáveis pela transmissão de vírus e bactérias aos seres humanos e/ou animais. A sua importância em Medicina humana e veterinária deve-se essencialmente, aos agentes patogénicos transmitidos pelas fêmeas flebotomínicas hematófagas ao efetuarem uma refeição sanguínea infetante num hospedeiro suscetível.

Lutzomyia verrucarum s.l. é o vetor da alfa-proteobactéria *Bartonella bacilliformis*, responsável pela bartonelose humana ou doença de Carrion, infecção limitada aos vales das montanhas Andinas, na América Latina (Alexander, 1995; Cohnstaedt et al., 2011). Nos casos humanos detectados, a doença apresenta-se em duas fases clínicas distintas: a fase aguda ou hemática, conhecida como “febre de Oroya”, e a fase eruptiva ou tecidular conhecida como a “verruga peruana” (Maroli et al., 2013).

Os flebotomíneos são também vetores de vários arbovírus, pertencentes a três diferentes gêneros: *Phlebovirus* (família *Bunyaviridae*) incluindo a “febre por flebótomos” causada pelos vírus Sicília, Nápoles e Toscana, e ainda o vírus Punta Toro, *Vesiculovirus* (família *Rhabdoviridae*) incluindo o vírus Chandipura e o *Orbivirus* (família *Reoviridae*) que inclui o vírus Changuinola, sendo estes os de maior importância em medicina (Depaquit et al., 2010; Maroli et al., 2013). Os vetores destes arbovírus pertencem aos gêneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Lutzomyia* (Valassina et al., 2003).

Os flebovírus estão amplamente distribuídos na região do Mediterrâneo, África, subcontinente Indiano, Médio Oriente e Ásia Central (Alkan et al., 2013). Alguns destes arbovírus estão associados a surtos ou casos relatados em humanos, na Europa Mediterrânea, sendo esta região considerada endêmica para os vírus Toscana, Nápoles e Sicília, existindo, assim, o risco de expansão destes vírus para áreas mais temperadas da Europa, onde potenciais vetores são abundantes.

Dentro do género *Phlebovirus*, o vírus Nápoles foi isolado a partir de *P. perniciosus*, na Itália, de *P. papatasi* também na Itália e no Egipto (Sabin et al., 1944; Schmidt et al., 1971), e de *P. perfiliewi*, na Sérvia (Gligic et al., 1982). O vírus Sicília foi isolado de *P. papatasi* em países da Bacia do Mediterrâneo e de *P. ariasi* na Ásia e na Argélia (Figura 1.5) (Tesh et al., 1977). Ambos os vírus são responsáveis pela denominada “febre por flebótomos”, também conhecida como febre papatacci ou febre dos três dias, detectados principalmente nos países da Bacia Mediterrânea (Valassina et al., 2003).

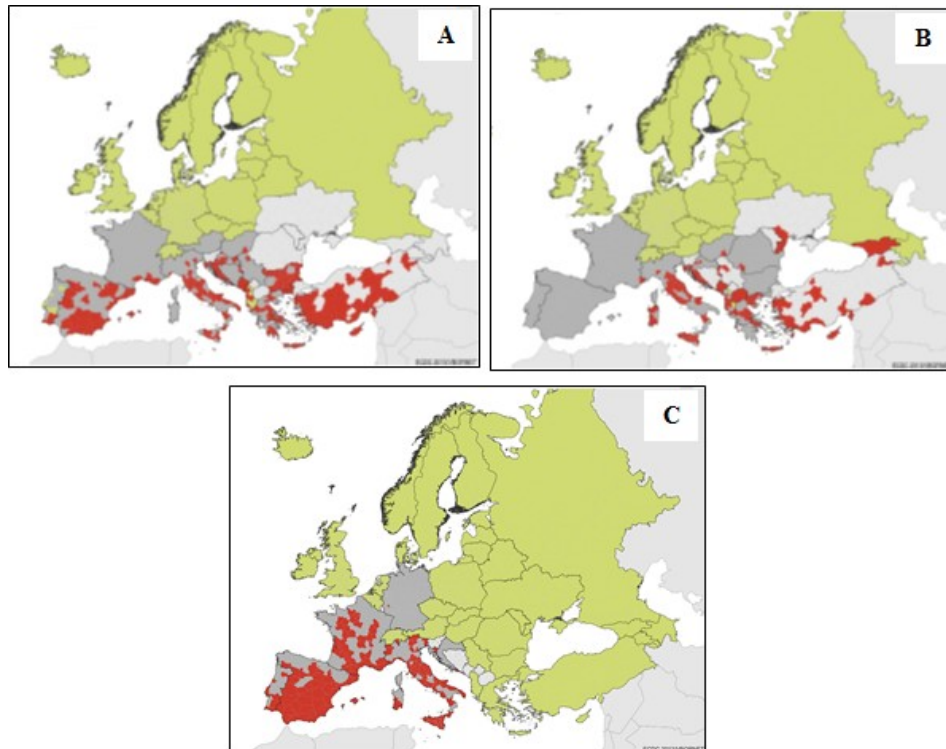


Figura 1.5: Distribuição dos principais vetores de flebovírus na Europa. (A) *P. papatasi*, (B) *P. perfliewi*, (C) *P. perniciosus* (Adaptado de Alkan et al., 2013)

O vírus Toscana, responsável por surtos de meningite aguda ou meningoencefalites em vários países da Bacia do Mediterrâneo (Itália, França, Espanha, Chipre e Portugal) durante a estação quente, período que coincide com a atividade dos vetores (Valassina et al., 2003; Charrel et al., 2012), foi isolado de *P. perniciosus*, pela primeira vez, e mais tarde de *P. perfliewi* em Itália (Verani et al., 1988). Recentemente, em França, foi detetado RNA deste vírus em *S. minuta*, espécie conhecida por se alimentar em répteis (Charrel et al., 2006). O vírus Toscana foi isolado pela primeira vez em humanos, em Portugal, num paciente sueco que contraiu a infeção no Algarve em 1983 (Ehrnst et al., 1985). Mais recentemente, no norte de Portugal, num estudo realizado em 106 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), colhidas entre 2002 e 2005, em pacientes com idade até 30 anos e meningite asséptica, foi detetado RNA de vírus Toscana em seis doentes (Santos et al., 2007).

No que diz respeito ainda aos flebovírus, uma grande percentagem foi isolada de flebótomos na América Central e na América do Sul, apesar de nestas regiões a infeção humana ser pouco comum.

O vírus Arbia foi isolado em *P. perniciosus* e em *P. perfiliewi*, o vírus Corfou em *P. major* na Grécia, o vírus Massilia foi isolado em França e detetado em Espanha em *P. perniciosus*, e o vírus Punique foi detectado em *P. perniciosus* e *P. longicuspis* na Tunísia (Zihoua et al., 2010).

Entre as nove espécies do género *Vesiculovirus* (família Rhabdoviridae), o vírus Chandipura é considerado de grande importância médica. Este vírus é endémico na Índia, onde foi isolado originalmente num paciente, suspeitando-se que flebótomos dos géneros *Phlebotomus* e *Sergentomyia* possam ser os seus vetores (Depaquit et al., 2010). Estudos laboratoriais mostraram que a espécie *P. papatasi* é um reservatório eficiente do vírus, permitindo o seu crescimento e transmissão venérea e transovárica (Tesh et al., 1977; Amaro et al., 2007). *P. argentipes* também permite, experimentalmente, a transmissão do vírus. Até à presente data, não foram relatados casos humanos na Europa e África, o que não exclui a possibilidade da introdução do vírus nestas regiões, devido a migrações populacionais.

O vesiculovírus Radi foi isolado em Itália, em *P. perfiliewi* mas não está associado a doença humana.

Existem 12 espécies do género *Orbivirus* (família Reoviridae) transmitidas por flebótomos nas Américas, pertencentes ao grupo do vírus Changuinola, no entanto, a transmissão de orbivírus ao Homem é excecional e a infeção humana parece resultar apenas em sintomas ligeiros, embora esteja ainda pouco documentada (Depaquit et al., 2010).

Como agentes de doença, os flebótomos são responsáveis pela Harara que se caracteriza por uma forte reação alérgica causada pela picada dos flebotomíneos aos seres humanos (Akhoundi et al., 2016).

1.4. Morfologia externa dos flebótomos: imagos e formas imaturas

Os flebotomíneos são insetos dípteros, de reduzidas dimensões, com 2 a 3 mm de comprimento, de aspeto frágil, que possuem antenas longas com 16 segmentos, idênticas em ambos os sexos, e apresentam uma coloração que pode variar de castanho claro

a quase preto, dependendo da espécie. O corpo dos imagos é profusamente revestido por finas sedas, incluindo as asas (Figura 1.6) (Lane,1993; Killick-Kendrick, 1999; Afonso & Alves-Pires 2008).



Figura 1.6: Flebotomíneo fêmea ingurgitada, após refeição sanguínea completa (Adaptado de Clementi et al., 2011)

Os flebotomos adultos apresentam um dimorfismo sexual acentuado através das estruturas das genitálias externas (Figura 1.7).

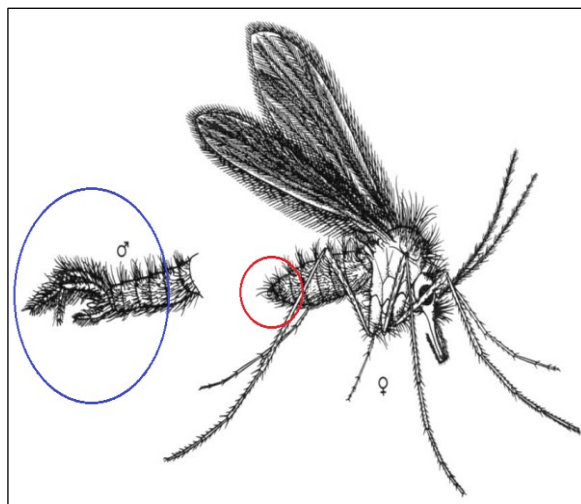


Figura 1.7: Posição de repouso de flebotomo, com as asas abertas em V. À esquerda – genitália externa de um macho; à direita – assinalado, com um círculo, os últimos segmentos abdominais de uma fêmea (Adaptado de Beran, 2010)

A cabeça é constituída por um par de olhos, um par de antenas com 16 segmentos, um par de palpos e um aparelho bucal picador-sugador nas fêmeas. Os olhos são compostos e localizados lateralmente. As antenas são longas e pilosas, possuem vários segmentos, dos quais se diferencia o escapo, o pedicelo e o flagelo composto por 14

segmentos, longos e delgados. Os palpos possuem 5 artículos e encontram-se inseridos ao nível das maxilas.

O aparelho bucal do tipo picador-sugador apenas está presente nas fêmeas, e este é formado por 7 peças, nomeadamente lábio, epifaringe, labro, um par de mandíbulas e um par de maxilas. É vulnerante nas fêmeas, uma vez que só estas são hematófagas, sendo a picada do tipo telmofágico. A fêmea, ao efetuar uma refeição sanguínea, faz inicialmente um micro-hematoma, no hospedeiro vertebrado, do qual o sangue é sugado e ingerido (“*pool feeding*”) (Afonso & Alves-Pires, 2008).

O número, tamanho e disposição dos dentes do cibário e da faringe são de considerável importância na distinção de alguns géneros (Lane, 1993).

O tórax apresenta um aspeto giboso, e na região dorsal do mesotórax inserem-se um par de asas lanceoladas e pilosas com 6 nervuras longitudinais, sendo a segunda nervura bifurcada 2 vezes. As asas dos adultos apresentam uma posição característica, em forma de V num ângulo de 90° em relação ao corpo, quando estes se encontram na posição de repouso (Figura 1.7). As nervuras das asas são amplamente usadas para distinguir géneros (Afonso & Alves-Pires, 2008).

O abdómen é constituído por 10 segmentos. Cada segmento é formado dorsalmente pelo tergito, ventralmente pelo esternito e a pleura que faz a conexão entre ambos. Em ambos os sexos, do 1º ao 7º tergito, estes encontram-se cobertos por microtríquias e por sedas em número e aspeto variáveis. A disposição das sedas nos tergitos apresenta importância taxonómica para a identificação dos géneros. Os três últimos segmentos encontram-se modificados para formar a genitália externa, que nos machos é composta por: gonostilo, cerco, gonocoxito, espinhas, parâmeros, edeago ou pénis, lobo lateral e presença/ausência de lobo basal. A genitália das fêmeas é constituída pelos quatro últimos segmentos abdominais que internamente apresentam as espermatecas e os canais condutores das mesmas.

No macho, os últimos segmentos posteriores têm a forma de garra e são utilizadas, durante a cópula, para segurar a fêmea. As estruturas da genitália externa são diferentes consoante as espécies e caso estas não apresentem rotação completa, os machos não estão funcionais para a cópula.

As formas imaturas dos flebótomos são: os ovos, as larvas e as pupas. O ovo é oblongo, com um comprimento que varia entre os 0,3 e 0,5 mm, apresenta um revestimento denominado por córion, com uma ornamentação variável e com coloração que inicialmente é branca ou cinzenta clara, mas frequentemente torna-se castanha escura ou preta passadas algumas horas após a oviposição.

As larvas que se desenvolvem ao longo de quatro estádios (LI a LIV) são vermiformes, podendo atingir até cerca de 8 mm de comprimento no quarto estádio, e possuem um aparelho bucal mastigador para se alimentarem da matéria orgânica de origem animal ou vegetal. Têm o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômem e apresentam o tegumento com sedas espinhosas. A cabeça encontra-se bem desenvolvida e quitinizada, o tórax e o abdômem são compostos por 3 e 9 segmentos, respetivamente. Este último apresenta duas sedas caudais no primeiro estádio e quatro nos restantes.

As pupas são globosas, com aproximadamente 3 mm de comprimento, apresentam o corpo dividido em cefalotórax (fusão da cabeça com o tórax) e abdômen, e não se locomovem nem se alimentam. Os seus últimos segmentos abdominais encontram-se cobertos pela exúvia larvar do último estádio (Afonso & Alves-Pires, 2008; Maroli et al., 2013).

1.5. Ciclo de vida e bioecologia dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos holometabólicos, exibem metamorfoses completas, passando pelos estádios de ovo, larva e pupa que são anatomicamente distintos do inseto adulto ou imago. O ciclo de vida dos flebótomos (Figura 1.8) desenvolve-se em meio terrestre (formas pré-imaginais) e em meio aéreo (imago), sendo a duração de cada uma das fases, variável consoante a espécie, condições climáticas (temperatura e humidade e fotoperíodo) e disponibilidade de alimento (Pires, 2000; Afonso & Alves-Pires, 2008; Maroli et al., 2013).

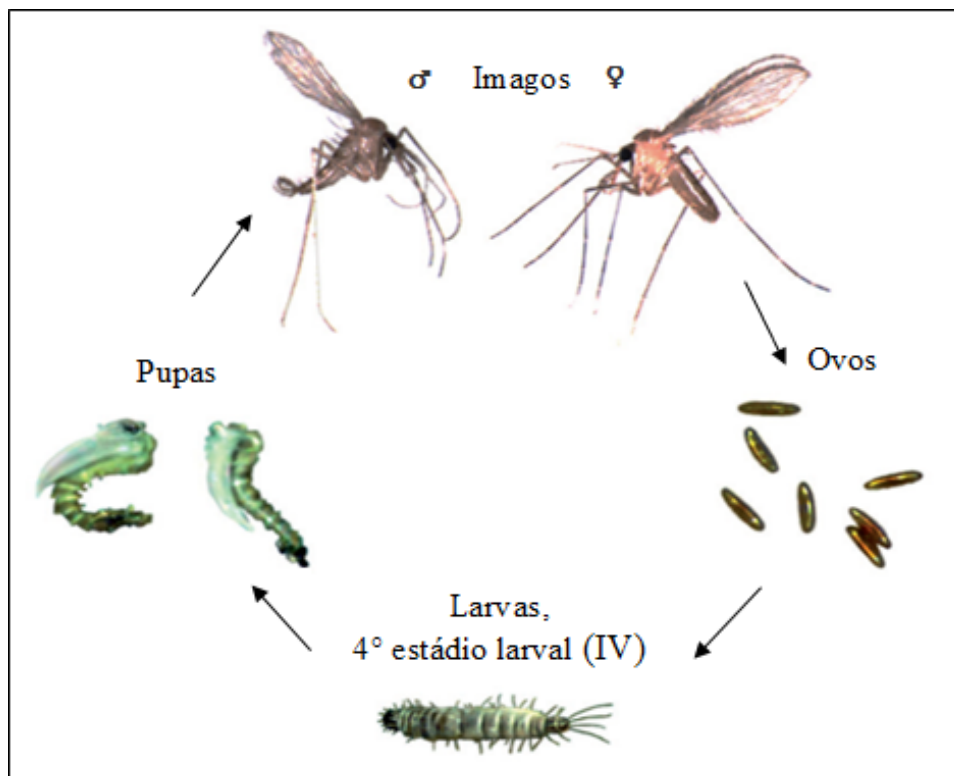


Figura 1.8: Ciclo de vida dos flebotomos: ovos, larvas, pupas e imagos - macho e fêmea (adaptado de Amaro, 2010)

As fêmeas de flebotomos efetuam posturas de cerca de 30 a 70 ovos, depositados isolados ou em pequenos lotes, em locais húmidos, escuros e abrigados, ricos em matéria orgânica e muitas vezes em decomposição. O período de incubação destes ovos varia entre 10 a 12 dias, e a eclosão das larvas ocorre geralmente entre 5 a 15 dias após a oviposição. Algumas espécies sofrem diapausa, ou quiescência, desencadeada por condições ambientais extremas, como verões quentes e secos ou temperaturas baixas e fotoperíodos mais curtos (Killick-Kendrick, 1978; Lawyer & Young, 1991). Em Portugal, as larvas do IV estágio entram em diapausa no inverno e passam a pupas na primavera do ano seguinte.

Após a eclosão, as larvas passam por quatro estádios, até à sua transformação em pupa, variando o período larvar com a temperatura e a alimentação, sendo de aproximadamente 21 dias (Pires, 2000). Na fase de pupa, os insetos sofrem uma reorganização interna para se transformarem em imagos, o que decorre em 5 a 10 dias, e nesta fase os machos emergem geralmente entre 24 a 48 horas antes das fêmeas (Lawyer & Perkins, 2000; Ferrolho et al., 2015). A passagem de ovo a adulto completa-se em cerca de 30 a

45 dias (Alexander, 2000) dependendo das condições climáticas e ambientais, sendo a longevidade dos flebotomíneos adultos variável entre 15 a 60 dias.

O desenvolvimento dos flebótomos dá-se a temperaturas entre os 17°C e os 31°C. Temperaturas acima dos 40°C destroem os ovos e as larvas e temperaturas abaixo dos 10°C param o desenvolvimento do ciclo. A humidade relativa é importante para a manutenção deste, no entanto, solos permanentemente encharcados não são criadouros (Lucientes et al., 2005). Em áreas temperadas, os adultos desaparecem no outono, porém, nas regiões tropicais a reprodução é contínua ao longo de todo o ano (Amaro, 2010).

Diversos aspetos da bioecologia dos flebótomos ainda são desconhecidos, particularmente dos estádios imaturos, visto que raramente são colhidos na Natureza e a informação existente é resultante de observações laboratoriais, nas colónias de várias espécies flebotomínicas. Isto faz com que seja difícil, por exemplo, estimar densidades ou a longevidade larvar em condições naturais.

A atividade flebotomínica é crepuscular e/ou noturna, variando consoante as espécies e a época do ano (Afonso & Alves-Pires, 2008; Maroli et al., 2013). Quanto à velocidade de voo, esta é lenta, inferior 1 m/s (Killick-Kendrick et al., 1986). Os flebótomos são incapazes de voar quando a velocidade do vento é superior à referida, sendo este o principal fator limitador da sua dispersão (Maroli et al., 2013). A autonomia de voo é normalmente muito curta (cerca de 300 m) e, portanto, as atividades dos adultos são geralmente restritas à vizinhança dos locais de reprodução das larvas (criadouros larvares) e à presença de hospedeiros vertebrados, fontes de alimentação das fêmeas. (Maroli et al., 2013). Contudo, as distâncias de dispersão variam conforme as espécies. A atividade sazonal dos flebótomos adultos é afetada principalmente pela temperatura, humidade, vento e precipitação.

Os machos e as fêmeas são fitófagos, alimentando-se de sucos e açúcares vegetais e de secreções produzidas por outros insetos, principalmente de afídeos (Hemiptera, Aphididea), de modo a obterem a energia suficiente para a sua sobrevivência (Afonso & Alves-Pires, 2008; Maroli et al., 2013). No entanto, as fêmeas são também hematófagas, tendo necessidade de se alimentar de sangue que pode ser de mamíferos, aves e répteis para que se possa dar a maturação ovárica, ou seja, para efetuarem as posturas. Apesar

deste fato, podem ser encontradas na Natureza, algumas espécies partenogénicas e autógenicas, estas últimas capazes de produzir ovos viáveis sem efetuarem uma primeira refeição sanguínea (Maroli et al., 2013). O número de refeições sanguíneas efetuadas por uma fêmea, a fim de completar o seu ciclo trofogónico varia consoante as espécies e condições climáticas e ambientais, mas geralmente apenas uma refeição sanguínea é suficiente, observando-se uma concordância trofogónica (Afonso & Alves-Pires 2008).

Ao contrário dos mosquitos, a atividade de picada é silenciosa (Maroli et al., 2013). Aproximam-se do alvo em pequenos voos, e ao picarem dilaceram a pele do hospedeiro com pequenos movimentos de vaivém formando um micro-hematoma de onde sugam o sangue (*pool feeding*) – telmofágicos, ao mesmo tempo que inoculam saliva com propriedades anticoagulantes e vasodilatadoras. A picada é geralmente dolorosa, a refeição sanguínea tem uma duração entre 30 segundos a cinco minutos, e a maioria das espécies são exofágicas e exofílicas (Branco, 2011).

As várias espécies flebotómicas podem apresentar diferenças na preferência por um ou outro animal como fonte sanguínea, como por exemplo o ser humano ou o cão. Assim, este comportamento poderá ter influência para que uma espécie seja ou não vetora ou a principal vetora.

No acasalamento, os machos reúnem-se formando um “enxame” sobre o hospedeiro vertebrado ou próximo deste, produzindo feromonas sexuais. As vibrações das asas dos machos juntamente com as feromonas libertadas servem de incentivo e/ou atração das fêmeas para que se dê a cópula (Oliveira et al., 2010; Maroli et al., 2013).

Os locais de repouso para os flebótomos são muitas vezes perto dos criadouros larvares (Maroli et al., 2013). Podem ser fendas das rochas, buracos nos muros e nas paredes, troncos de árvores, abrigos de animais, grutas e zonas de densa vegetação (Alexander, 2000).

Os machos eclodem com a genitália extrena não rodada e, durante as primeiras 16-24 horas de vida no estado de adulto, esta tem de realizar uma rotação completa sobre o eixo longitudinal de 180° para assumir uma posição madura (Ferreiro et al., 2015).

Devido ao conhecimento dos locais de repouso e de reprodução dos flebótomos ser escasso, a sua localização pode ser prevista através das características das genitálias externas dos machos que podem estar parcial, total, ou não rodadas.

1.6. O parasita: *Leishmania* spp.

O parasita protozoário *Leishmania*, responsável pelas leishmanioses, pertence ao filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e género *Leishmania* Ross, 1903. Do género *Leishmania* fazem parte dois subgéneros, o subgénero *Leishmania* presente no Velho e Novo Mundo e o subgénero *Viannia* presente apenas no Novo Mundo (Bates, 2007). Das cerca de 30 espécies de *Leishmania* descritas, aproximadamente 20 espécies são patogénicas para o ser humano (Ready, 2014; Akhoundi et al., 2016).

Durante o seu desenvolvimento, as espécies do género *Leishmania*, apresentam duas formas morfológicas principais: uma forma promastigota extracelular no aparelho digestivo do inseto vetor e e uma forma amastigota intracelular que parasita os macrófagos dos hospedeiros vertebrados (Bates, 2007; Bari & Rahman, 2008). Estruturas básicas como o núcleo, cinetoplasto e um corpo basal ao qual se encontra associado um flagelo são componentes celulares que fazem parte de ambas as formas, apesar destas variarem em tamanho e aspeto morfológico. O cinetoplasto, em forma de bastonete, contém uma quantidade importante de DNA mitocondrial (kDNA) (Tomás & Romão, 2008).

A forma promastigota com aspeto fusiforme, apresenta um corpo longo com cerca de 10 a 20 μm de comprimento e 1,5 a 3,0 μm de largura. Possui um núcleo com posição central, o cinetoplasto localizado entre o núcleo e a extremidade anterior da célula e um longo flagelo livre que emerge do corpo basal na extremidade anterior da célula conferindo mobilidade ao parasita (Bari & Rahman, 2008; Dawit, 2013).

A forma amastigota apresenta um corpo ligeiramente redondo ou oval, medindo 2 a 6 μm de comprimento, contendo um núcleo no polo posterior da célula, um cinetoplasto, que contém grande quantidade de DNA, e não possui flagelo livre. Estas formas

estão bem adaptadas à temperatura corporal e ao meio ácido dos fagolisossomas e multiplicam-se por divisão binária dentro dos vacúolos de macrófagos do hospedeiro vertebrado.

1.6.1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. nos flebótomos vetores

O protozoário do género *Leishmania* spp. é um parasita com um ciclo de vida heteroxeno, em que parte do seu desenvolvimento ocorre num hospedeiro invertebrado, e a outra parte ocorre num hospedeiro vertebrado (Figura 1.9). O ciclo de vida deste parasita, em ambos os hospedeiros (vetor e hospedeiro vertebrado), compreende um processo complexo que envolve alterações comportamentais, morfológicas e bioquímicas.

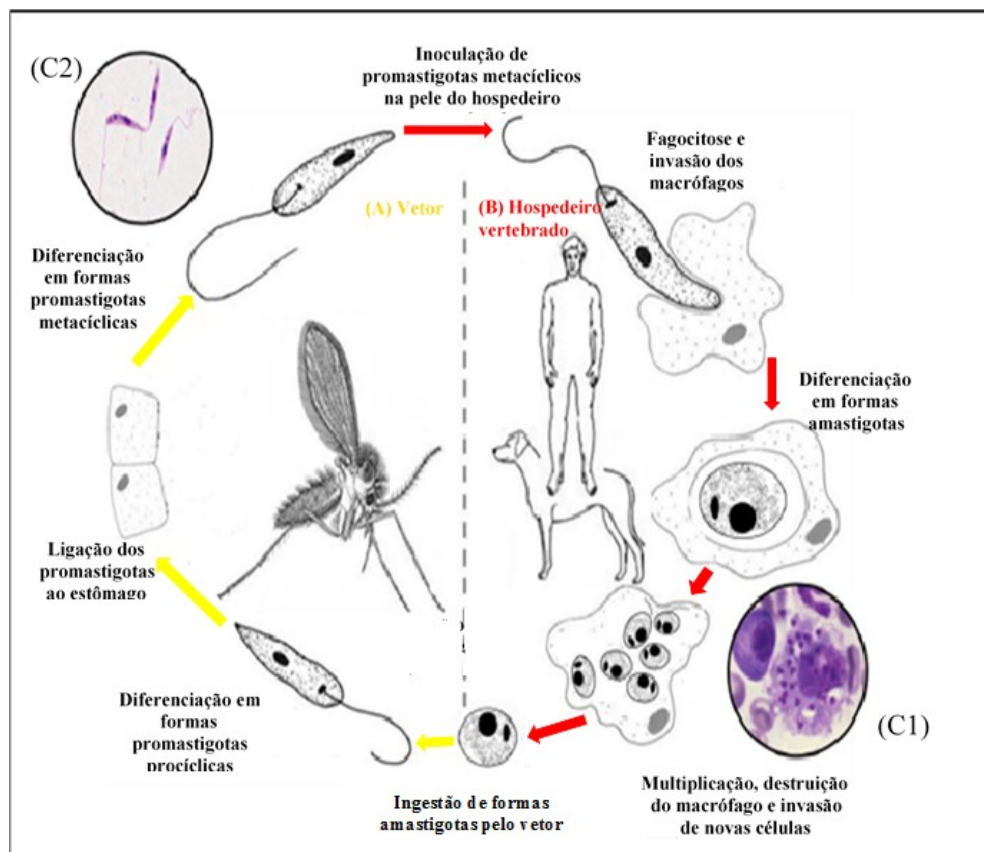


Figura 1.9: Ciclo de vida de *Leishmania* spp.; (A) inseto vetor flebotomínico; (B) hospedeiros vertebrados e (C1) e (C2) formas amastigotas e promastigotas do parasita, respetivamente (Adaptado de Beran, 2010)

Apenas as fêmeas flebotomínicas transmitem, por picada, o parasita, uma vez que só estas efetuam refeições sanguíneas que necessitam para realizar a maturação ovárica (Tomás & Romão, 2008). O ciclo inicia-se quando um inseto vetor flebotomíneo fêmea infetado e infetante, efetua uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado suscetível e inocula as formas promastigotas metacíclicas do parasita.

As formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas pelos macrófagos, transformando-se em formas imóveis, os amastigotas. No interior dos macrófagos multiplicam-se provocando a destruição das células fagocíticas, com a libertação das formas amastigotas e consequente invasão de novas células do sistema mononuclear fagocítico.

A invasão do hospedeiro vertebrado por parasitas *Leishmania* envolve todas as componentes de defesa do sistema imunitário humoral e celular. Os macrófagos são células especializadas na destruição de agentes patogénicos, mas as leishmanias possuem estratégias que lhes permitem contrariar a função dos macrófagos e resistir ao sistema imunitário do hospedeiro, causando infeção.

O desenvolvimento do parasita no interior do inseto vetor, que ocorre no tubo digestivo dos flebótomos é um processo complexo (Figura 1.10), traduzindo-se em diversas transformações e multiplicações do parasita. As formas amastigotas ingeridas juntamente com o sangue aquando da refeição sanguínea efetuada pelo vetor, num hospedeiro infetado, passam para o intestino médio (região abdominal do estômago) do mesmo.

No intestino médio do vetor, as formas amastigotas estão sujeitas à ação da membrana peritrófica, que é uma estrutura em forma de saco, segregada pelo proventrículo do inseto. Esta membrana encontra-se completamente formada 24 horas após a ingestão de sangue, e em resposta ao estímulo sanguíneo protege o epitélio do intestino do conteúdo da refeição sanguínea. As formas amastigotas transformam-se em promastigotas flagelados, e a membrana peritrófica começa a desintegrar-se, libertando os promastigotas para o intestino posterior (espécies de *Leishmania* do subgénero *Viannia*) ou para o intestino médio (espécies de *Leishmania* do subgénero *Leishmania*). Após 18 a 24 horas, na região abdominal do estômago, ocorre a transformação em promastigotas procíclicos livres, que são curtos e ovóides possuindo um pequeno flagelo, e dividem-se ativamente por cissiparidade.

Após 48 a 72 horas da refeição sanguínea, verifica-se um abrandamento da multiplicação e os promastigotas procíclicos diferenciam-se em formas flageladas, delgadas e longas que correspondem às nectomonas, que por sua vez possuem bastante mobilidade. Estas são as formas migratórias que se acumulam na extremidade anterior da matriz peritrófica.

Ao fim de 4 a 7 dias, após a refeição sanguínea, as formas nectomonas movem-se anteriormente para a válvula estemodeal onde se fixam à membrana quitinosa, através de hemidesmossomas produzidos na membrana do flagelo. A função da válvula estemodeal consiste em impedir que o sangue ingerido retroceda no canal alimentar. A libertação de quitinasas por parte do parasita vai danificando-a impedindo o seu normal funcionamento e a secreção de um gel secretor dos promastigotas (SPG) dá origem a um “rolhão” que dificulta a passagem do sangue para o estômago.

Nesta fase as nectomonas diferenciam-se em leptomonas, formas mais curtas, que prosseguem a multiplicação. Algumas das formas nectomonas/leptomonas aderem à superfície da válvula e diferenciam-se em haptomonas (Bates, 2007).

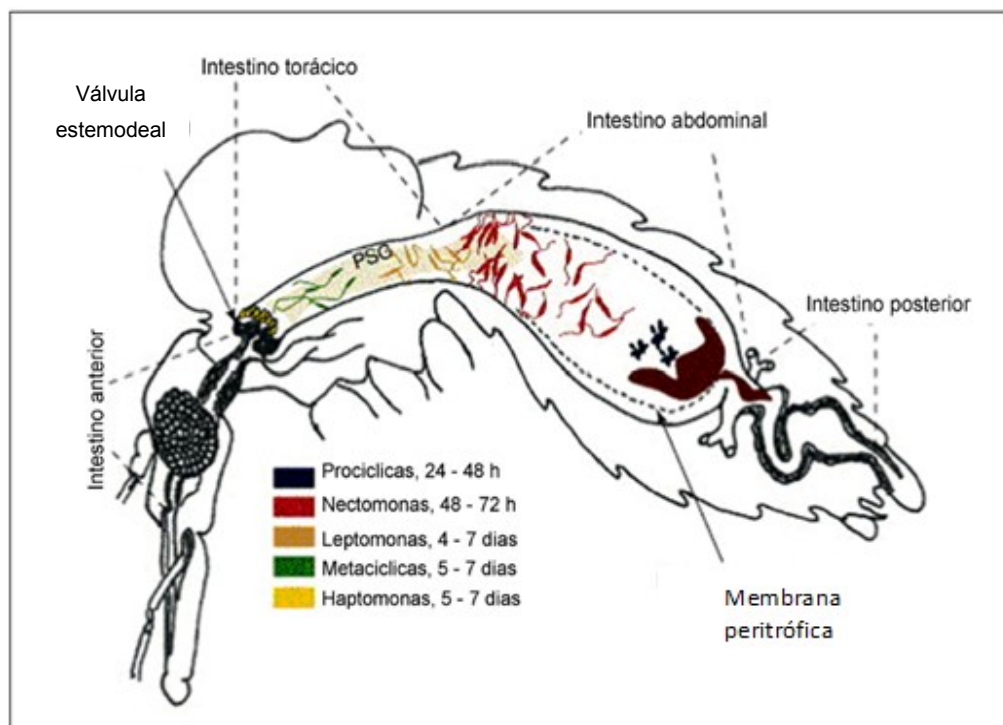


Figura 1.10: Ciclo de vida intravetorial de *Leishmania* sp.: formas procíclicas, nectomonas, leptomonas, hatomonas e metacíclicas infetantes (adaptado de Kamhawi, 2006; Afonso & Alves-Pires, 2008).

A metaciclogénese fica geralmente concluída ao fim de 7 a 9 dias, com a transformação de algumas leptomonas em formas metacíclicas do parasita. Aquando da picada telmofágica, são depositadas na pele de um novo hospedeiro vertebrado e, desde que este seja suscetível ao parasita, mantém-se o ciclo e consequentemente, o foco de leishmaniose numa determinada área/região (Bates, 2007).

Atualmente e segundo os Investigadores Killick-Kendrick (1990), Bates (2007) e Ready (2011, 2013) para que uma determinada espécie flebotomínica seja incriminada como vetora, é necessário que esta obedeça aos seguintes critérios:

1- Tendência antropofílica ou zooantropofílica (a espécie tem de se alimentar no ser humano e em caso de zoonose o vetor tem de se alimentar também no animal reservatório);

2 – A distribuição geográfica do flebótomo, do parasita e do vertebrado tem que ser coincidente, demonstrando forte associação ecológica, incluindo sazonalidade (tem que estar presente na mesma região onde ocorre a doença);

3 – As formas infetantes do parasita *Leishmania* sp. (na válvula estemodeal) encontradas na fêmea flebotomínica, na Natureza, têm que ser da mesma espécie e zimodeme das formas isoladas no Homem e/ou animal;

4 – A fêmea flebotomínica tem de ser capaz de suportar o desenvolvimento do parasita após a digestão e excreção da refeição sanguínea, e ainda ser capaz de o transmitir por picada (susceptibilidade e competência vetorial);

5 – A longevidade da fêmea tem de ser superior ao período de incubação extrínseca do parasita;

6 – A fêmea deve ficar infetada após a realização de uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado infetado; esta transmissão pode ser realizada experimentalmente (por exemplo através de xenodiagnóstico);

7 – Abundância da espécie flebotomínica deve ser elevada;

8 - Utilizando dados retrospectivos e modelos matemáticos, deve ser possível demonstrar que o vetor é essencial para a manutenção da transmissão, com ou sem o envolvimento de outros vetores secundários;

9 - Os modelos matemáticos, baseados em programas de controlo planeado, devem demonstrar que a incidência da doença decresce significativamente a seguir ao decréscimo significativo da “*biting density*” do vetor específico.

1.7. Distribuição das leishmanioses em Portugal, espécies flebotomínicas e, eventuais modificações com as alterações climáticas

Portugal é uma região endémica de leishmaniose humana, visceral e cutânea, e canina (LCan), em que o cão doméstico é o principal reservatório de *L. infantum*, sendo *P. perniciosus* e *P. ariasi* as espécies flebotomínicas comprovadamente vetoras deste protozoário (Pires, 1984; Alves-Pires et al., 1991; Alves-Pires et al., 2001; Maia et al., 2009; Campino & Abranches, 2002; Campino et al., 2006). Os gatos domésticos podem ser reservatórios (Maia et al., 2010; Maia & Campino, 2011) e as raposas (*Vulpes* sp.) são consideradas o principal reservatório silvático (Abranches et al., 1983).

A presença de cães infetados desempenha um papel fundamental na manutenção da LV humana, apesar de não ser evidente a existência de uma relação direta entre a prevalência da LCan e a leishmaniose humana. O Observatório Nacional da Leishmaniose, em Portugal, disponibiliza *on line* os valores correspondentes à seroprevalência da LCan (Figura 1.11).

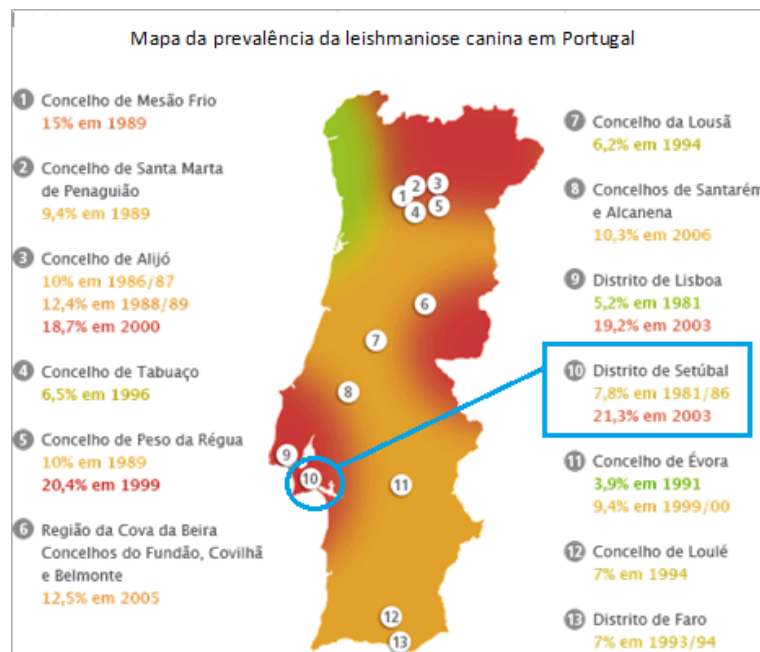


Figura 1.11: Seroprevalência da Lcan em Portugal: assinalado, a azul, a seroprevalência no distrito de Setúbal – área de estudo flebotomínico deste trabalho (Adaptado de <http://www.onleish.org/index.php>, acedido a 13 de 09 de 2016)

A LV foi pela primeira vez descrita em Portugal, em 1910, por Alvares numa criança de nove anos de idade, residente em Lisboa. Foi no ano de 1912 que se deu início ao estudo dos flebotomos em Portugal, quando, pela primeira vez, foi assinalado em Colares (Sintra), a presença de *Phlebotomus* (*Phlebotomus*) *papatasi* Scopoli, 1786, pelo Doutor Carlos França, médico, investigador, bacteriologista, parasitologista, entomologista e flebotomologista. Decorridos seis anos, em 1918, o Doutor Carlos França assinalou *P. (Larroussis) perniciosus* Newstead, 1911 no Porto e *P. (Paraphlebotomus) sergenti* também em Colares, correspondendo desde modo à primeira referência destas duas espécies na Europa (Afonso et al., 2007a).

Em Portugal, até à presente data, foram assinaladas cinco espécies flebotomínicas, pertencentes a dois géneros:

Género *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840

Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi Scopoli, 1786

Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti Parrot, 1917

Phlebotomus (Larroussius) perniciosus Newstead, 1911

Phlebotomus (Larroussius) ariasi Tonnoir, 1921

Género *Sergentomyia* França & Parrot, 1920

Sergentomyia (Sergentomyia) minuta Rondani, 1843

As espécies flebotomínicas assinaladas no nosso País, distribuem-se de norte a sul, salientando-se os três principais focos de leishmaniose: Trás-os-Montes e Alto Douro, Grande Lisboa/Arrábida e Algarve.

Em Portugal, observa-se atividade flebotomínica de abril a novembro, terminando a temperaturas inferiores a 12°C. Consoante a espécie e região em que se encontram, os ciclos dos flebótomos podem variar de monofásicos a bifásicos, ou seja, com um ou dois picos de eclosão de imagos, por ano.

Phlebotomus perniciosus é o principal vetor de *L. infantum* no País. Verifica-se a sua presença de norte a sul, mas é no sul que apresenta densidades mais elevadas (Gomes et al., 2012). Com grande importância médica e veterinária, este vetor encontra-se muitas vezes associado às atividades humanas, em meios urbanos e rurais. Na Arrábida, Alto Douro e Algarve, foi encontrado parasitado por *Leishmania* sp. (Campino & Maia, 2010).

P. ariasi encontra-se na parte ocidental da Sub-região Mediterrânica, incluindo Portugal, e apresenta maiores densidades a norte do país, uma vez que tem preferências por regiões quentes mas húmidas (Pires, 1984; Alves-Pires et al., 1991; Afonso et al., 2007b).

P. papatasi, no País, é uma espécie considerada rara, uma vez que até à presente data, só se tem encontrado, nas últimas décadas, no Alentejo e no Algarve. Ainda que o Doutor Carlos França tenha capturado, no início do século passado em Colares, exem-

plares desta espécie nunca mais foram encontradas sem ser nas regiões acima citadas. É natural que assim seja, uma vez que esta espécie é de regiões quentes mas áridas. Assim, se o sul de Portugal se tornar mais seco e quente, é provável que a densidade aumente, assim como a sua distribuição possa expandir-se mais para o centro do País.

P. sergenti foi descrito por Parrot, em 1917, na Argélia. Esta espécie é comprovadamente vetora de *L. tropica* Wright, 1903, na Arábia Saudita (Al-Zahrani et al., 1988), em Marrocos (Guilvard et al., 1991) e na Etiópia (Gebre-Michael et al., 2004). Em Portugal, a distribuição de *P. sergenti* verificava-se a sul do Tejo (Afonso et al., 2005) mas, em estudos mais recentes, observou-se a expansão para o centro norte do País (Branco et al., 2013; Vilela et al., 2016).

Sergentomyia minuta foi descrita como *Phlebotomus minuta* por Camille Rondani, em 1843, a partir de um exemplar capturado no norte de Itália, sendo posteriormente assinalada também em Malta, por Newstead, em 1911.

Em Portugal continental, *S. minuta* encontra-se amplamente distribuída, desde Bragança ao Algarve (Meira & Ferreira, 1944; Azevedo, 1946; Pires, 1979; Schrey et al., 1989; Semião-Santos et al., 1995; Alves-Pires et al., 2001). Considera-se que há espécies do género *Sergentomyia* que podem picar o ser humano (Hoogstraal et al., 1962), embora não existiam evidências de que possa transmitir agentes patogénicos ao Homem. Contudo, foi detetada a presença de RNA do vírus Toscana em *S. minuta* em França (Charrel et al., 2006) e de DNA de *L. major*, numa fêmea capturada numa área rural de Albufeira, no Algarve (Campino et al., 2013).

Em 2016, foi descrita a primeira deteção de DNA de *Leishmania tarentolae*-like em *S. minuta* em Espanha (Bravo-Barriga et al., 2016). Assim, a importância médica desta espécie parece estar a aumentar, uma vez que até há poucos anos julgava-se que apenas se alimentava em reptéis e era vetora de *Sauroleishmania*.

1.8. Principais metodologias utilizadas para a monitorização dos flebótomos, como vetores de *Leishmania* sp.

A monitorização dos flebótomos envolve um conjunto de procedimentos que permitem obter informações sobre as espécies vetoras, em determinada área geográfica, de forma a contribuir para o conhecimento da sua bioecologia, epidemiologia da doença e avaliar o risco de transmissão de *Leishmania* spp. aos seres humanos e/ou animais.

As informações adquiridas através de metodologias aplicadas, na monitorização das espécies flebotomínicas, são de extrema importância para o controlo integrado das leishmanioses.

Em áreas ou regiões, em que nunca se tenham aplicado medidas de monitorização flebotomínica, deve-se, antecipadamente, realizar um levantamento no que diz respeito a:

- prevalência e incidência de casos de leishmaniose, tanto humana, como animal;
- estudos e/ou investigações realizadas na respetiva área, até à data em questão;
- no caso de existirem estudos anteriores, saber quais as metodologias que foram utilizadas;
- caracterizar a região em termos geográficos, climáticos e ambientais (Afonso et al., 2007b; Pires, 2000).

Para a monitorização flebotomínica deve-se:

- selecionar os métodos de captura a utilizar, de acordo com os objetivos que se pretendem atingir;
- efetuar a identificação morfológica dos exemplares capturados;
- realizar a identificação de *Leishmania* sp. em todas as fêmeas capturadas;
- identificar as fontes alimentares das fêmeas ingurgitadas;
- determinar a abundância relativa e as densidades das espécies;
- determinar a variação sazonal das mesmas;

- relacionar a presença de espécies flebotomínicas com o risco de transmissão vetorial (Pires, 2000; Branco, 2011; Branco et al., 2013).

A amostragem flebotomínica deve ser efetuada através da realização de capturas em diferentes localidades e biótopos, determinando, sempre as coordenadas geográficas, as condições ambientais e climáticas (Branco et al., 2013).

As capturas dos adultos podem ser efetuadas através de:

- armadilhas luminosas CDC, com ou sem fonte de dióxido de carbono;
- papéis adesivos, impregnados com óleo de rícino, ou outro (Afonso et al, 2005).

A utilização de papéis adesivos impregnados com óleo de rícino é bastante usada na determinação das espécies flebotomínicas existentes numa área ou região. Contudo, corre-se o risco dos insetos serem danificados e perderem-se estruturas essenciais para a identificação morfológica (Pires, 2000).

- Por procura ativa, em locais de repouso dos flebótomos, como por exemplo grutas, pode-se utilizar aspiradores eléctricos manuais, permitindo a captura de exemplares vivos. Estes aspiradores são utilizados frequentemente quando se pretende capturar fêmeas ingurgitadas ou grávidas (Alexander, 2000).

A prospeção de estádios imaturos, é pouco realizada, uma vez que existe uma grande dificuldade em encontrar criadouros destas formas na Natureza, por se distribuírem por vários tipos de locais, mesmo de ínfimas dimensões, como seja, pequenos buracos em muros (Alexander, 2000; Sangiorgi et al., 2012; Casanova et al., 2013).

- Quanto às capturas sobre isco humano, ou animal, são fiáveis quando se pretende determinar os hospedeiros vertebrados em que as espécies flebotomínicas se alimentam preferencialmente (preferências hemáticas) e as taxas de agressividade para o Homem ou animal.

Contudo, estes métodos apresentam risco elevado para os seres humanos em áreas endémicas, não sendo, portanto, aconselhável a sua utilização.

A determinação da infeção natural por *Leishmania* spp., em flebotomíneos, é um elemento muito importante de vigilância, previsão de risco de transmissão vetorial e de

alerta para a expansão flebotomínica, como vetores, em áreas endêmicas ou outras cujas condições bioclimáticas se tornem favoráveis.

A identificação das espécies de *Leishmania* é então, extremamente importante para a implementação de medidas de controlo (Schallig & Oskam, 2002).

A pesquisa da infecção natural, por *Leishmania* spp., em fêmeas flebotomínicas, pode realizar-se através de:

- disseção do aparelho digestivo do inseto, ao estereomicroscópio, para a pesquisa de formas metacíclicas infetantes na válvula estemodeal, e observação ao microscópio ótico;
- seguida de isolamento do parasita em meio de cultura NNN (*Novy-MacNeal-Nicolle*) (Pires, 2000).

A disseção flebotomínica permite:

- determinar a taxa de infecção;
- observar a atividade das formas parasitárias intravetoriais;
- localizar as formas promastigotas no vetor;
- isolar a estirpe de *Leishmania*, para posterior análise isoenzimática e genotípica (Brazil et al., 2014).

Contudo, esta técnica requer um elevado grau de experiência e grande assépsia, quer do local de isolamento, quer nos procedimentos laboratoriais.

A identificação isoenzimática teve início nos anos 80 e é considerada o método de referência para a identificação das diferentes espécies e estirpes (zimodemes) de *Leishmania*, traduzindo-se na análise da mobilidade electroforética de isoenzimas (Campino et al., 2006).

O uso de técnicas moleculares, tais como a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), a PCR, seguida de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e sondas de hibridação, tem aumentado a sensibilidade e a especificidade da identificação do parasita em flebotomíneos vetores (Saraiva et al., 2010). Estes métodos permitem identificar até um único parasita, mesmo em condições em que existe excesso de DNA de inseto.

As referidas técnicas moleculares apresentam ainda como vantagem:

- poder-se processar, em simultâneo, vários exemplares, verificado-se menos esforço laboratorial do que com a deteção parasitária por disseção (Maia et al. 2009).

Contudo, a disseção, quando se consegue observar as leishmânias na válvula estemodal e realizar posterior cultura, já referida, prova que a fêmea dissecada estava não só infetada mas também infetante com determinada espécie (zimodeme) de *Leishmania*.

A informação obtida através da identificação das refeições sanguíneas, das fêmeas de diferentes espécies, é essencial para compreender aspetos da sua bioecologia, nomeadamente informações sobre os seus hospedeiros vertebrados preferenciais e os seus padrões de alimentação em condições naturais.

Deve-se, assim, relacionar a presença de espécies vetorais, as taxas de infeção flebotomínica, por *Leishmania*, as preferências hemáticas das fêmeas ingurgitadas e a prevalência da(s) leishmaniose(s) nas áreas monitorizadas para que se possa realizar o controlo vetorial de forma integrada e sustentável.

1.9. Importância do controlo vetorial nas regiões endémicas de Leishmaniose

Para que se possa efetuar o controlo vetorial integrado e eficaz, no âmbito deste sistema biológico, torna-se imprescindível o conhecimento da:

- epidemiologia;
- distribuição;
- bioecologia das espécies flebotomínicas, numa dada região;
- comportamento face às condições climáticas e ambientais;
- presença humana e reservatórios animais (Afonso & Alves-Pires 2008; Lane, 1991).

O controlo vetorial integrado pode, em diversas situações, ser implementado envolvendo a combinação de diferentes métodos/estratégias, com o intuito de:

- diminuir a densidade flebotomínica;

- reduzir ou interromper (risco) a transmissão da doença;
- diminuir a incidência da infecção;
- prevenir o aumento de um ou mais focos já existentes;
- prevenir epidemias (Alexander & Maroli, 2003).

As medidas utilizadas para o controlo vetorial direcionado para as formas imaturas são pouco viáveis, uma vez que os seus criadouros são geralmente difíceis de localizar na Natureza. Assim, na maioria das áreas endémicas, as medidas de controlo são efetivamente limitadas ao controlo dos flebótomos adultos. Porém, se em determinadas áreas, os flebótomos machos capturados apresentarem as genitálias externas parcialmente, ou totalmente não rodadas, poder-se-á estar próximo de criadouros larvares (Ferrolho et al., 2015).

Os métodos de controlo direcionados ao vetor flebotomínico incluem o controlo químico, controlo ambiental e ainda as medidas de proteção individual (Alexander & Maroli, 2003).

Estes métodos de controlo devem ser acompanhados da educação para a saúde e de vigilância entomológica. Especialmente em regiões endémicas de leishmaniose, estes métodos devem ser adaptados ao comportamento específico dos vetores, uma vez que o comportamento destes difere entre espécies.

O controlo ambiental tem o intuito de tornar o ambiente impróprio para a sobrevivência e reprodução das espécies flebotomínicas. Este controlo pode ser realizado através da destruição dos locais de reprodução, como por exemplo, as tocas de roedores para *P. papatasi* e *P. duboscqi*, este último vetor natural de *L. major* na Etiópia e no Quênia. Ainda medidas como a cobertura de fendas e buracos em casas, muros e abrigos de animais, com uma mistura de cal e lama, têm-se demonstrado eficazes para o controlo de espécies vetorais (Alexander & Maroli, 2003; Wasserberg et al., 2014).

Para as espécies flebotomínicas peridomésticas, a reorganização e limpeza de áreas peridomiciliárias e de abrigos de animais domésticos, reduz a probabilidade do vetor adquirir criadouros adequados ao seu desenvolvimento.

Em relação ao controlo químico, este envolve a utilização de inseticidas tais como os organofosfatos, os carbamatos e os piretróides sintéticos, de modo a reduzir ou

limitar a presença do vetor. Os organoclorados (DDT) demonstraram eficácia na redução da densidade flebotomínica e da incidência da Leishmaniose quando utilizados em regiões endêmicas, como o Brasil e a Índia (Programa Nacional de Erradicação da Malária). Contudo, a utilização destes métodos químicos levantam, geralmente problemas ambientais, uma vez que os inseticidas não são seletivos e em muitos casos eliminam outros organismos. Até ao momento, a resistência ao DDT encontra-se limitada à Índia e às espécies *P. papatasi*, *P. argentipes* e *S. shortii* (Alexander & Maroli, 2003; Desjeux, 2004).

A utilização de materiais impregnados com inseticidas (piretroides), como por exemplo, redes mosquiteiras, cortinas, coleiras para cães, no Brasil e na Europa (devido à transmissão de *L. infantum*), têm demonstrado eficácia na prevenção de LCan.

O uso de repelentes, pode ser uma alternativa para a proteção individual contra as picadas dos flebótomos, mas utilizado como uma medida de intervenção de saúde pública é muito difícil, uma vez que é oneroso e não muito prático para uso constante/habitual.

Quanto ao controlo biológico há ainda o cultivo de plantas autóctones nocivas/repelentes para os flebótomos (Schlein et al., 2001). Verifica-se ainda o uso de feromonas sintéticas para atrair os flebótomos para pequenos locais com inseticidas (Bray et al., 2009).

Presentemente, verifica-se também a utilização de vacinas contra a Lcan que atuam para benefício direto do cão, que é o reservatório de *L. infantum* e, indiretamente para o ser humano. Assim, o risco de transmissão para os cães e humanos diminui.

As regiões endêmicas devem ser sujeitas a:

- monitorização contínua;
- avaliações das estratégias de controlo vetorial aplicadas;
- vigilância;
- comunicação adequada de modo a fornecer indicação sobre o efeito do controlo aplicado.

Independentemente dos métodos antivetoriais que possam ser aplicados, as populações locais, assim como os media, devem estar a par do que se pretende efetuar e

dos benefícios gerais que poderão usufruir, em relação à saúde pública e animal. Só desta forma, poderemos ter acesso e colaboração dos habitantes, que tão importantes são, no que diz respeito às medidas de monitorização e controlo a serem incrementadas e/ou continuadas.

1.10. Objetivos

Objetivo geral

Caraterizar a fauna flebotomínica existente numa área rural, nunca antes prospectada, inserida no concelho de Palmela, distrito de Setúbal, Portugal.

Objetivos específicos

- Capturar flebótomos (Diptera, Psychodidae), por armadilhas luminosas CDC, numa estação flebotomínica, previamente determinada, na região de Palmela, em local contatado e autorizado pelo proprietário.
- Identificar morfologicamente as diferentes espécies flebotomínicas capturadas.
- Determinar a abundância relativa, a densidade, a razão dos sexos e a variação sazonal das espécies, durante o período de atividade flebotomínica.
- Caracterizar os aspetos bioecológicos presentes na estação selecionada, e relacionar com os tipos de biótopos prospectados: presença ou ausência das diferentes espécies flebotomínicas capturadas.
- Determinar a taxa de infeção por *Leishmania* sp. e as refeições sanguíneas das fêmeas capturadas, por técnicas de biologia molecular, e relacionar com o eventual risco de transmissão vetorial.
- Contribuir para o esclarecimento da fauna flebotomínica no concelho de Palmela, e relacionar com outras regiões endémicas de Portugal, particularmente com a região da Arrábida, distrito de Setúbal.

- Determinar parâmetros flebotômnicos, passíveis de comparação através da mesma estação flebotômica, com interesse num futuro próximo, tendo em conta eventuais alterações climáticas e ambientais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Distrito de Setúbal, concelho e freguesia de Palmela, localidade de Brejos do Assa: caracterização geral da região estudada

O distrito de Setúbal localiza-se na costa ocidental da Península Ibérica, em Portugal. Enquadra-se administrativamente na Grande Área Metropolitana de Lisboa (GAML), no que diz respeito à Península de Setúbal, e encontra-se limitado a norte pelo rio Tejo e distritos de Lisboa e Santarém, a sul pelo distrito de Beja, a oeste pelo oceano Atlântico e a leste pelo distrito de Évora. Apresenta uma área total aproximadamente de 5 000 Km² com uma localização geográfica a 38° 31' 32"N (Latitude Norte) e 8° 53' 6"O (Longitude Oeste).

As duas áreas territoriais do distrito englobam a Península de Setúbal, da qual fazem parte os concelhos de Almada, Montijo, Barreiro, Alcochete, Seixal, Sesimbra, Moita, Palmela e Setúbal, e o Litoral Alentejano que integra os concelhos de Alcácer do Sal, Grândola, Sines e Santiago do Cacém (Figura 2.1).

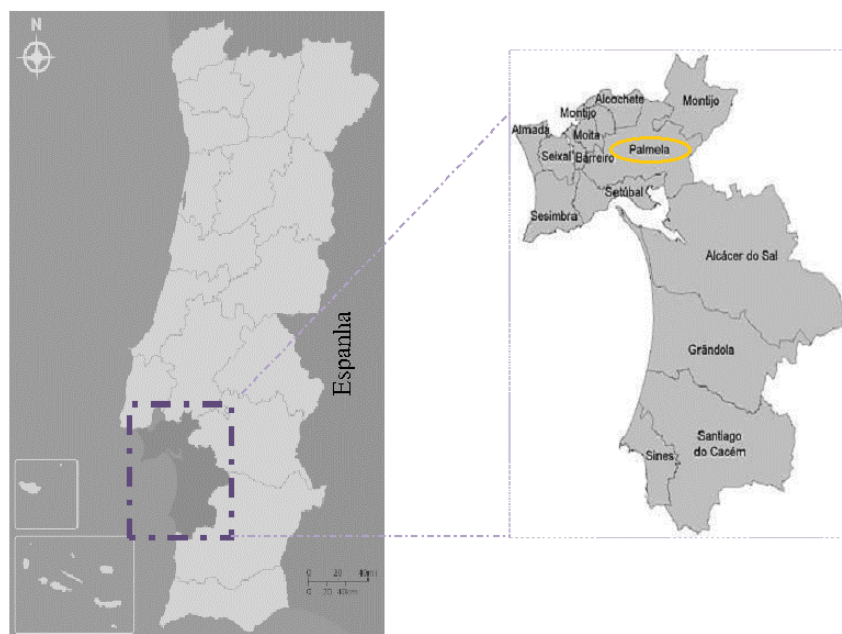


Figura 2.1: Mapa de Portugal com a localização do distrito de Setúbal e respetivos concelhos. O concelho de Palmela encontra-se assinalado (Fonte: Anuário Estatístico de Palmela, 2013)

Geograficamente, o concelho de Palmela insere-se na Península de Setúbal (NUTS III), na região de Lisboa (NUTS II), que inclui quatro freguesias: Palmela, sede de Concelho e centro administrativo, Pinhal Novo, Quinta do Anjo, e união das freguesias de Marateca e Poceirão, distribuídas por uma área de aproximadamente 465 Km², sendo o maior Concelho da GAML e do distrito a que pertence (Figura 2.2) (Anuário Estatístico de Palmela, 2013).

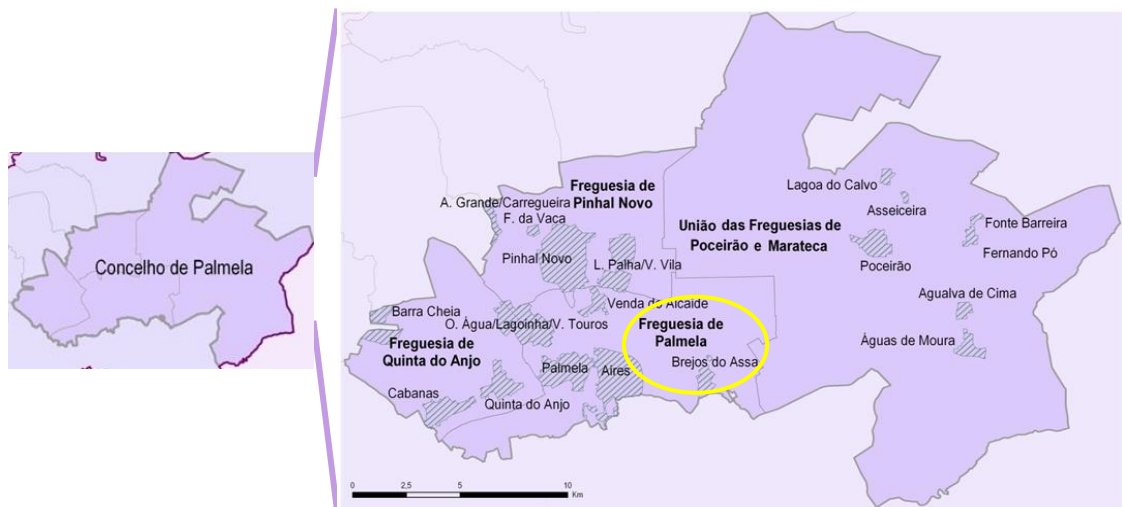


Figura 2.2: Mapa do concelho de Palmela, assinaladas a freguesia de Palmela e a localidade de Brejos do Assa, que corresponde especificamente à região de estudo – estação flebotomínica (38° 34' 6''N-8° 50'16''W) (Fonte: Anuário estatístico de Palmela, 2013)

A freguesia de Palmela, de características rurais, com vastos terrenos agrícolas e algumas zonas industriais, apresenta uma área com cerca de 77 Km² e tem como principais localidades: Palmela, Volta da Pedra, Aires, Baixa de Palmela, Brejos do Assa, Algeruz, Lau, Areias Gordas, Venda do Alcaide, Lagoinha e Vale de Touros.

A área de estudo, nomeadamente a estação flebotomínica, que se insere na localidade de Brejos do Assa, apresenta uma localização de 38° 34' 6''N e 8° 50'16''W, uma altitude de 39 m, com características ambientais tipicamente rurais.

2.1.1. Aspetos demográficos, fitogeográficos, faunísticos, climáticos e ambientais.

Para a caracterização dos aspetos demográficos, fitogeográficos, faunísticos, climáticos e ambientais da região de estudo, teve-se em conta o fato de esta estar inserida na Península de Setúbal e serem as características desta Península que mais influenciam a estação flebotomínica.

O distrito de Setúbal apresenta, no total, uma população de 845.858 habitantes, a Península de Setúbal 781.000 habitantes e o concelho de Palmela 62.831 habitantes (Quadro 2.1). Das quatro freguesias que compõem o Concelho, as Freguesias de Pinhal Novo e Palmela são as que apresentam maior número de habitantes residentes, com 25.003 e 17.481, respetivamente. Desde 1991, que os Concelhos mais populosos são Almada, Seixal e Setúbal e o menos populoso Alcochete. Na última década, Alcochete, Montijo e Sesimbra registaram crescimentos demográficos acima dos 30%, seguindo-se Palmela com 17,2% (INE, 2011).

Quadro 2.1: Área, Nº de habitantes e densidade populacional do distrito e península de Setúbal, concelho e freguesia de Palmela (adaptado de INE, 2011)

Localização	Área	Nº de habitantes	Densidade populacional (Nº de habitantes/Km ²)
Distrito de Setúbal	5214 Km ²	845.858	171
Península de Setúbal	1625Km ²	781.000	480,6
Concelho de Palmela	465,13 Km ²	62.831	137,1
Freguesia de Palmela	77,51 Km ²	17.481	225,53

Ocupando uma posição central, entre três das mais importantes áreas protegidas nacionais, o Parque Natural da Arrábida (PNA), a Reserva Natural do Estuário do Sado (RNES) e a Reserva Natural do Estuário do Tejo (RNET), o concelho de Palmela envolve uma surpreendente diversidade de flora e fauna (Canelas, 1999).

O PNA envolve cerca de 1450 espécies e subespécies de flora. Nas zonas abrigadas da cordilheira da Arrábida predominam o carvalho-cerquinho (*Quercus faginea*), o carrasco (*Quercus coccifera*), o aderno (*Phillyrea latifolia*), o medronheiro (*Arbutus unedo*), a aroeira (*Pistacia lentiscus*) e a urze (*Erica arborea*). Outras espécies que se podem encontrar nesta região são o sobreiro (*Quercus suber*) e a azinheira (*Quercus rotundifolia*), que predominam na zona sul do concelho (Canelas, 1999; CMP, 2016). Em termos edafo-climáticos (zonas ecológicas onde se consideram as condições de formação do solo, climáticas e hidrológicas) a zona que corresponde ao maciço calcário, onde convergem as influências atlânticas e mediterrânicas pode ser considerada Calco-atlantemediterrânea, segundo as classificações da Carta Ecológica de Portugal (1982).

Na Arrábida a fauna é também muito diversificada, e alguns dos mamíferos que se podem encontrar são, a raposa (*Vulpes vulpes*), o gato-bravo (*Felis silvestris*), a doninha (*Mustela nivalis*), o saca-rabos (*Herpestes ichneumon*), o texugo (*Meles meles*), o toirão (*Mustela putorius*), a toupeira (*Talpa occidentalis*), o mordanho (*Suncus etruscus*), o gineto (*Genetta genetta*), o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) e a lebre (*Lepus capensis*). Em relação aos insetos destaca-se a existência de mais de 300 espécies de borboletas e 450 de coleópteros. A avifauna também se distingue nesta região com a existência de espécies como o picapau-verde (*Picus viridis*), o estorninho (*Sturnus unicolor*) e o melro azul (*Monticola solitarius*), entre outros (CMP, 2016).

Na área do concelho de Palmela, incluída na RNES, existe uma área muito representativa de montado de sobreiro, azinho e pinheiro manso. Mas do ponto de vista biogeográfico, o território Sadense, que corresponde aos terrenos associados à bacia sedimentar do Sado predominam os sobreiros. Na zona ribeirinha do concelho encontram-se áreas de salinas, sapais, arrozais e unidades de aquacultura. A fauna terrestre no RNES engloba cerca de 31 espécies de mamíferos, destacando-se a lontra (*Lutra lutra*), gamos (*Dama dama*) e ainda o gato-bravo (*Felis silvestris*). A fauna piscícola do Estuário envolve uma grande diversidade de peixes, moluscos e crustáceos (Pina, 1995).

Dada a sua localização, o distrito de Setúbal apresenta áreas com marcadas variações climáticas, apresentando características mediterrânicas mas com intensa influência atlântica. O clima é misto, subtropical e mediterrânico, sendo influenciado pela proximidade do mar, pelas bacias hidrográficas do Tejo e do Sado, e pelas serras e montes

que se situam na região. Apresenta fracas amplitudes térmicas e um índice pluviométrico que se situa entre os 400 a 500 mm (CMP, 2016). Verifica-se em Palmela um clima temperado e as temperaturas médias oscilam entre os 11°C, em janeiro, e os 23°C, em agosto, com temperaturas consideradas amenas e baixos níveis de precipitação.

A constituição geológica da Península de Setúbal é exclusivamente sedimentar, com larga representação de argilas, areias, arenitos, conglomerados, margas e calcários, de diferentes períodos e distintas composições e texturas (DGDR, 1993). Em toda a sua extensão, Palmela apresenta uma heterogeneidade traduzida na existência de áreas territoriais com utilidades diferentes: propriedades agrícolas de grande extensão de exploração restrita; áreas de povoamento disperso relativas a pequenas e médias propriedades (vivendas e pequenas herdades, ou quintas) e outras áreas de utilização mista. A zona nascente do concelho, correspondendo à União das Freguesias de Marateca e Poceirão, é caracterizada por áreas de paisagem alentejana, cujos principais traços são a existência de grandes propriedades rurais.

Quase na sua totalidade, a Península de Setúbal é constituída, por terrenos planos de baixa altitude com suaves ondulações, raramente ultrapassando os 150 metros de altitude, apresentando nessas zonas solos arenosos e ácidos. A grande exceção verifica-se na área da qual faz parte a Serra da Arrábida, acidente muito marcado que se desenvolve ao longo do litoral meridional, que, para além de conter o ponto mais alto da península no anticlinal do Formosinho (501 m), é exclusivamente calcária. Nesta zona, em que o relevo é mais acentuado, com altitudes entre os 100 e os 500 metros, os solos são classificados maioritariamente em argilo-calcários (Canelas, 1999).

As principais serras do distrito de Setúbal são a Serra da Arrábida e a Serra de Grândola. O distrito é atravessado pelo Rio Sado e os seus afluentes, e são principalmente os estuários do Tejo e do Sado, o PNA e a zona protegida da Arrábida Fóssil da Costa da Caparica, os elementos cruciais que contribuem para o equilíbrio ambiental de toda a região (CMP, 2016).

2.2. Captura flebotomínica na estação de Brejos do Assa, Palmela, Setúbal, 2015

2.2.1. Consentimento dos proprietários, informações e seleção dos biótopos a prospectar na área de estudo

Previamente ao início da escolha dos biótopos, que apresentariam as condições apropriadas para capturas de flebótomos, os proprietários da quinta, localizada em Brejos do Assa, deram o seu consentimento para que se realizassem as capturas flebotomínicas durante o período do estudo, ou seja na época de atividade flebotomínica do ano de 2015. Foram informados previamente acerca da importância do estudo a realizar e sobre todos os procedimentos que seriam efetuados ao longo dos meses de prospeção. Solicitou-se a colaboração na pesquisa dos locais que seriam eventualmente prospectados, demonstrou-se como funcionavam as armadilhas para a captura de insetos e informou-se quais os horários da colocação e recolha das armadilhas CDC.

A estação flebotomínica ($38^{\circ} 34' 6''\text{N}$ e $8^{\circ} 50' 16''\text{W}$) insere-se num ambiente rural, uma quinta com aproximadamente 6.300 m^2 , constituída por uma habitação domiciliar e um terreno amplo utilizado para exploração agrícola e uma área dedicada à criação de animais para consumo próprio e venda (Figura 2.3).



Figura 2.3: Diferentes aspetos da estação flebotomínica rural, Brejos do Assa, 2015 (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

2.2.2. Período de prospeção flebotomínica

O período de prospeção decorreu de 13 de junho a 12 de novembro de 2015 e as capturas foram efetuadas, em média, em duas noites consecutivas por semana. No total, foram realizadas 26 saídas de campo e utilizaram-se, no conjunto, 102 armadilhas luminosas CDC, uma por biótopo.

2.2.2.1. Divisão e caracterização dos vários tipos de biótopos prospetados

Na estação flebotomínica escolhida, houve o cuidado de efetuar a seleção de biótopos a prospectar em diferentes sítios, que não se conhecesse a presença de ventos intensos e que não houvesse, na proximidade das armadilhas, nem luzes artificiais, nem animais que as pudessem danificar.

Caracterizaram-se os locais de captura num raio de dois metros da colocação da armadilha luminosa CDC, uma vez que esta é a distância a que os flebótomos são teoricamente atraídos pela mesma. No total foram escolhidos 16 biótopos para a colocação das armadilhas.

Dadas as características rurais da estação flebotomínica, os tipos de biótopos amostrados foram divididos em dois grupos, domésticos e peridomésticos, uma vez que não estavam presentes biótopos silváticos.

Foram considerados biótopos domésticos, todos os biótopos contíguos a habitação humana, excluindo-se os que eram utilizados unicamente para o resguardo de animais. Os biótopos domésticos foram ainda descritos de acordo com a presença ou ausência de animais de companhia, nomeadamente cães e/ou gatos, de livre circulação pelo biótopo amostrado (Branco, 2011).

Os biótopos domésticos foram divididos em três variedades:

- Casa/exterior - janela/jardim da habitação: zona contígua à habitação, pavimentada, perto de uma janela, coberta na parte superior por uma rede, com uma churrasqueira e com circulação de gatos (A), espaço maioritariamente ocupado com plantas ornamentais (B, C, D, E) e algumas árvores de fruto, nomeadamente nespereiras (F) (Figura 2.4).

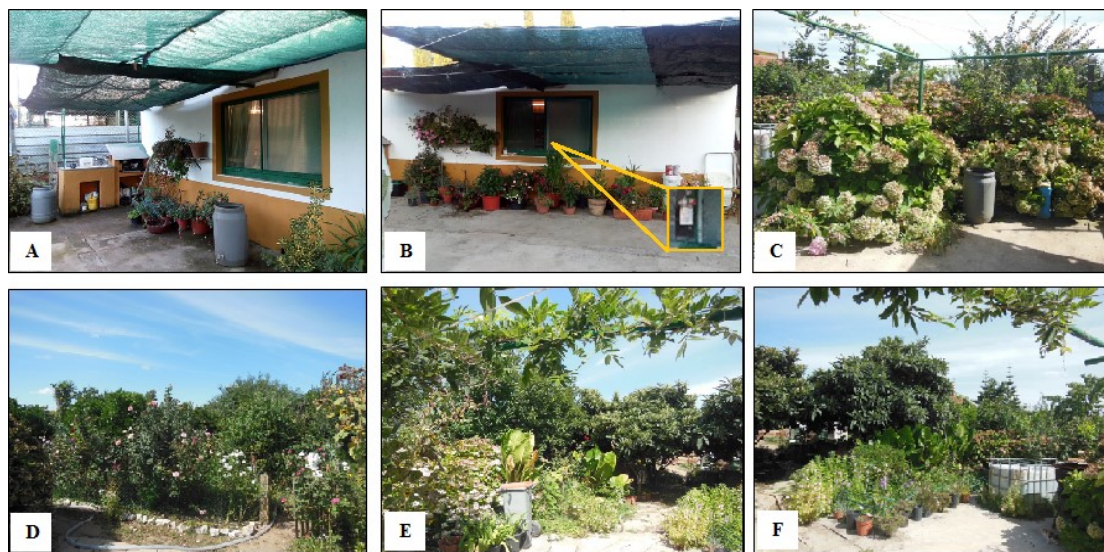


Figura 2.4: Biótopo doméstico, variedade - Casa exterior: janela/jardim da habitação. Na figura B está assinalada uma armadilha CDC (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

- Casa/exterior – depósito de lenha: zona junta à habitação, coberta, encontrando-se a menos de um metro da sala de estar da habitação, utilizada para resguardo de lenha e de diferentes utensílios, pavimentada e com um termoacumulador no seu interior. Zona com circulação de animais de companhia (A e B) (Figura 2.5).



Figura 2.5: Biótopo doméstico: depósito de lenha (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

- Casa arrecadação/interior: zona mais afastada da habitação, utilizada principalmente para armazenamento de veículos de transporte, máquinas (A e B) e utensílios agrícolas (C) (Figura 2.6).



Figura 2.6: Biótopo doméstico - arrecadação interior (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

Dos biótopos peridomésticos, fizeram parte todos os abrigos de animais domésticos. A variedade de biótopos foi definida de acordo com a espécie animal presente. No caso de abrigos que albergavam mais do que uma espécie animal, ou quando a armadilha CDC foi colocada num espaço intermédio (a menos de dois metros), entre abrigos de espécies diferentes, estes foram considerados abrigos mistos.

Assim, foram consideradas variedades de biótopos peridomésticos as seguintes:

- Abrigos que albergavam apenas uma espécie de animais: coelheiras, curral de caprinos e curral de ovinos;

- Abrigos mistos: galinheiros, local onde se alojavam as aves de capoeira de diferentes espécies: patos (A), galinhas (B) e perus (C) (Figura 2.7);



Figura 2.7: Biótopos peridomésticos: abrigos mistos (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

Estes biótopos peridomésticos encontravam-se divididos em pequenos anexos que funcionavam de resguardo para os diferentes animais. Durante o dia, os anexos eram mantidos abertos para livre circulação dos animais. Em alguns destes anexos encontravam-se armazenados utensílios agrícolas e produtos destinados à alimentação de animais de pequeno porte.

- Reservatório de água exterior (A); árvores de fruto (B) (Figura 2.8 e Figura 2.9).

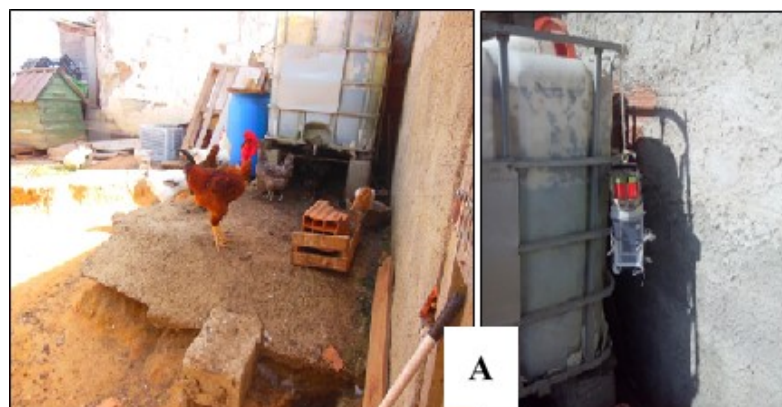


Figura 2.8: Biótopo peridomésticos: reservatório de água (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)



Figura 2.9: Biótopo peridoméstico: árvore de fruto, nespereira e macieira (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

As árvores de fruto (macieiras, pereiras, ameixieiras e outras), agrupadas nos biótopos peridomésticos, encontravam-se na horta familiar, com solo rico em matéria orgânica. Verificavam-se ainda pequenos espaços destinados ao cultivo de espécies hortícolas para consumo doméstico (milho, girassol, couves, tomate, batata, feijão e abóbora).

2.2.2.2. Ficha de campo utilizada para as variedades de biótopos prospectados

A área delimitada para a captura de flebotomos foi alvo de uma caracterização detalhada com base na observação e recolha de dados de campo, tendo em conta as particularidades do lugar prospectado. A partir da observação e caracterização da área e respetivos tipos e variedades de biótopos, efetuou-se uma Ficha de Campo adequada à estação flebotomínica que se pretendia estudar. Para cada variedade de biótopo, em que se colocou a respetiva armadilha, utilizou-se uma Ficha de Campo (numerada), que neste caso foi do nº1 ao nº102, onde todos os dados foram registados.

Na Ficha de Campo, adaptada de Branco, 2011(Anexo nº1), foram registados vários aspetos referentes a cada variedade de biótopo, desde dados climáticos (temperatura, humidade relativa, velocidade do vento e pluviosidade), à flora predominante e tipo de hospedeiros vertebrados existentes que, eventualmente pudessem consistir na fonte de alimentação sanguínea das espécies flebotomínicas. Em suma, registaram-se:

- N° do biótopo;
- A localização geográfica da estação flebotomínica (localidade e coordenadas - latitude, longitude e altitude);
- A data e as horas de colocação e recolha das armadilhas luminosas do tipo CDC, e a duração total da captura efetuada;
- O tipo de solo (tipo de formação superficial), e a vegetação predominante;
- O local de captura, as espécies animais e respetivas quantidades existentes no local e visíveis até 20 metros da armadilha;
- A temperatura e a humidade relativa determinadas, no local durante a colocação e recolha das armadilhas, por um termohigrómetro
- A velocidade do vento, no local prospectado na altura da colocação das armadilhas e na sua recolha, obtida através de um anemómetro
- As fases lunares, presentes nos períodos de capturas;
- Quaisquer outras observações que fossem relevantes para o trabalho.

Também se efetuou o registo fotográfico dos diferentes biótopos.

2.2.2.3. Método de captura flebotomínica

Para captura dos flebotomíneos foram utilizadas armadilhas luminosas miniaturizadas do tipo CDC (*Hausherr's Machine Works, Old Freehold Road, Toms River, NJ 08753, USA* – Figura 2.10).

Em todo o período de prospeção o uso exclusivo destas armadilhas teve como principal objetivo, a obtenção de exemplares de espécies flebotomínicas em bom estado de conservação para sua posterior identificação morfológica.

As armadilhas luminosas miniaturizadas do tipo CDC são compostas por uma estrutura metálica, da qual fazem parte, um sistema elétrico, uma fonte luminosa (lâmpada de 6V e 60mA), uma ventoinha, uma rede metálica de malha quadrada de 1 cm², uma gaiola de rede, de *Nylon*, de malha fina fixada à armação metálica, e na zona lateral um suporte de pilhas. Os insetos que apresentam fototropismo positivo, como é o caso dos flebótomos (Maroli et al., 2013), são atraídos pela fonte luminosa, e aspirados pela ventoinha para a gaiola, ficando retidos, pela rede, os insetos de maiores dimensões.



Figura 2.10: Aspectos da armadilha luminosa miniaturizada do tipo CDC
(Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

Devido ao tamanho e ao fácil manuseamento, as armadilhas apresentam uma grande facilidade de transporte, de um local para outro, sendo extremamente úteis tendo em conta as particularidades das variedades dos biótopos prospectados. Na estação flebotômica, foram colocadas a uma altura do solo inferior a 1,5 metros, sendo estas eficazes na atração de flebótomos num raio de dois metros (Killick-Kendrick, 1985; Killick-Kendrick, 1999). Uma vez que os flebótomos têm atividade crepuscular e/ou noturna, as armadilhas foram colocadas ao final da tarde, entre as 18 e as 20 horas e retiradas entre as 6 e as 8 horas da manhã seguinte.

2.2.2.4. Conservação dos exemplares capturados

Após as gaiolas serem retiradas, estas eram devidamente etiquetadas com o mesmo nº correspondente ao nº da Ficha de Campo (biótopo - variedade) e os artrópodes capturados transportados, desde o local de captura até ao local de processamento laboratorial do material, em caixas isotérmicas, com acumuladores a 4°C, mantendo assim os flebótomos vivos mas menos ativos nas respetivas gaiolas. Posteriormente, no Laboratório destinado ao estudo morfológico das espécies flebotômicas, UEI Parasitologia Médica, IHMT, os artrópodes eram mortos pelo frio a -20°C. De seguida, eram aspirados com um aspirador elétrico manual (*Hausherr's Machine Works*) e transferidos

para frascos de plástico contendo etanol a 90%, etiquetados com o nº do biótopo e a data de captura. Após este processamento, os exemplares foram mantidos à temperatura ambiente, cerca de 23°C, até posterior trabalho laboratorial.

2.2.2.5. Processamento do material capturado para identificação morfológica

Para a identificação morfológica dos flebotomíneos capturados, estes foram, numa primeira fase, separados, por sexo, e dos restantes artrópodes. Os exemplares, conservados em frascos de plástico contendo etanol a 90%, devidamente etiquetados, foram transferidos para placas de Petri e, após observação das suas características morfológicas ao estereomicroscópio (*Wild Heerbrugg*, M-8) com uma ampliação de 12x, e com o auxílio de duas pinças entomológicas, os machos e fêmeas foram colocados separadamente em tubos de plástico mais pequenos e etiquetados, igualmente em álcool a 90% (Figura 2.11). Os restantes artrópodes foram descartados ou separados para outros estudos entomológicos. Os flebótomos machos e fêmeas foram mantidos à temperatura ambiente, cerca de 23°C, até à identificação morfológica das espécies.

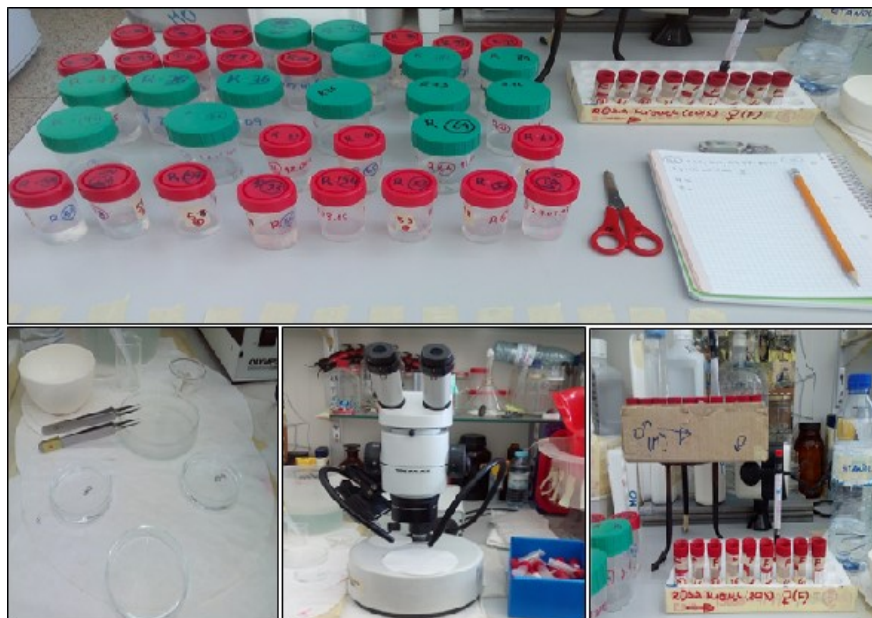


Figura 2.11: Separação dos flebotomíneos capturados, por sexo (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

2.2.3. Identificação morfológica das espécies flebotomínicas capturadas

A identificação morfológica das espécies flebotomínicas, de ambos os sexos, foi efetuada no Laboratório de Entomologia Médica, de acordo com duas chaves dicotômicas de identificação, uma para machos e outra para fêmeas, descritas previamente por Branco, 2011. Estas chaves dicotômicas incluem espécies flebotomínicas assinaladas na região Mediterrânica, nomeadamente espécies descritas em Portugal, Espanha e Marrocos. Assim, os flebótomos capturados foram identificados, com base nas suas características morfológicas externas (machos e fêmeas) e internas (fêmeas – identificação das espermatecas).

2.2.3.1. Identificação dos flebotomíneos machos

A identificação de machos, ao nível da espécie, foi efetuada com base na observação ao estereomicroscópio das características morfológicas da genitália externa, utilizando a chave dicotómica referida anteriormente (Figura 2.12).

Os exemplares conservados em etanol a 90% e nos frascos de plástico devidamente identificados, por nº de biótopo e data de captura, foram transferidos com o auxílio de uma pipeta de plástico, para uma placa de Petri, contendo álcool a 90% e, posteriormente, e individualmente, para um godé de vidro. A observação foi realizada ao estereomicroscópio com uma ampliação de 56x e a identificação morfológica realizada a partir da uma chave dicotómica para as espécies flebotomínicas supracitadas. O registo das espécies identificadas, o respetivo biótopo e data de captura, a anotação de determinados aspetos, como por exemplo o grau de rotação da genitália dos machos, foram sempre assinalados no caderno de laboratório.

2.2.3.2. Identificação dos flebotomíneos fêmeas

A identificação morfológica das fêmeas, a nível de espécie, foi efetuada ao microscópio óptico, a partir da observação da morfologia da genitália interna (forma e segmentação das espermatecas), seguindo a chave dicotómica adaptada de Branco, 2011. A identificação morfológica das espermatecas requer a seguinte preparação:

- Com uma pinça entomológica, retira-se, individualmente, uma fêmea que se coloca numa lâmina ao estereomicroscópio;
- Com duas agulhas de disseção, previamente esterilizadas à chama de uma lamparina, efetuou-se o corte dos últimos três segmentos abdominais;
- Os três últimos segmentos abdominais foram colocados numa das extremidades da lâmina à qual se tinha previamente adicionado, com uma vareta de vidro, duas gotas de soluto de Marc-André (soluto esclarecedor). Este soluto, utilizado no meio de montagem a frio, passados dois a três minutos, permite a clarificação dos últimos segmentos do abdómen das fêmeas e assim a observação das diferentes estruturas das espermatecas.
- As espermatecas, após a colocação de uma microlamela, foram observadas ao microscópio óptico para identificação da(s) espécie(s), com ampliações de 125x, 312x e 500x (Figura 2.12).



Figura 2.12: Identificação das espécies de flebotomíneos fêmeas ao estereomicroscópio e ao microscópio óptico (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

O procedimento foi repetido para todas as fêmeas capturadas, o que obrigava à esterilização à chama das pinças e agulhas utilizadas entre cada disseção e montagem, de modo a evitar a ocorrência de contaminações entre exemplares. O restante corpo de cada fêmea foi colocado num tubo de 1,5 ml, devidamente identificado e registado, contendo 50 µl de Cell Lysis (Citomed, Portugal), conservado a -20°C para posterior extração de DNA (análise molecular).

Relativamente ao registo fotográfico, durante a identificação das fêmeas de flebotomos, as fotografias das espermatecas foram obtidas ao microscópio (Olympus BX51) com câmara fotográfica incorporada (Figura 2.13).



Figura 2.13: Registro fotográfico das espermatecas das fêmeas, por microscopia óptica, obtido durante a identificação das espécies (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

2.2.3.3. Determinação do número de fêmeas grávidas

Durante a identificação das fêmeas de flebótomos, registou-se a presença ou ausência de ovos no abdômen, classificando as fêmeas como grávidas ou não grávidas. Efetuou-se o registo do número de fêmeas grávidas, por espécie, no caderno de laboratório.

2.2.3.4. Determinação do número de fêmeas ingurgitadas

Da mesma forma, durante a observação das fêmeas capturadas, fez-se o registo da presença de sangue no abdômen, classificando a refeição sanguínea como: completa, parcial, digerida ou ausente. As fêmeas ingurgitadas foram registradas, por espécie, no caderno de laboratório para posterior identificação das refeições sanguíneas por técnicas de biologia molecular.

2.2.4. Determinação da abundância relativa das espécies flebotomínicas

A abundância relativa é definida como o número de exemplares de uma determinada espécie de flebótomos em relação ao número total de exemplares capturados das várias espécies, a multiplicar por cem, expresso em percentagem (%).

2.2.5. Determinação da densidade flebotomínica por espécie, variação sazonal, de junho a novembro de 2015

A densidade flebotomínica (D) corresponde ao número de flebótomos capturados por espécie, por armadilha CDC e por noite.

$$D = \text{N}^{\circ} \text{ flebótomos} / \text{armadilha CDC} / \text{noite}$$

As densidades foram determinadas durante cinco meses, cujas temperaturas, humidades e fotoperíodo são compatíveis com a eventual presença das espécies flebotomínicas existentes na região em estudo. A variação da densidade flebotomínica das espécies capturadas, permite aferir os prováveis picos de maior ou menor eclosão e a atividade flebotomínica sazonal.

2.2.6. Determinação da razão dos sexos

A razão dos sexos compreende o número total de machos a dividir pelo número total de fêmeas. Este parâmetro pode, ou não, indicar a maior atratividade do tipo de armadilha utilizada para um dos sexos dos flebotomíneos capturados.

2.2.7. Proporção de fêmeas alimentadas e grávidas

Compreende o número de fêmeas de flebótomos alimentadas e grávidas, sobre o número total de fêmeas capturadas, a multiplicar por cem (%).

2.2.8. Grau da rotação da genitália externa dos machos: total, parcial e sem rotação

O grau de rotação da genitália externa dos machos foi observado ao estereomicroscópio aquando da identificação morfológica dos mesmos e, tal como dito anteriormente, registado no caderno de laboratório. A genitália externa foi classificada quanto ao seu estado de rotação em: total, parcial e sem rotação.

2.2.9. Taxa de infestação por ectoparasitas

A taxa de infestação por ectoparasitas refere-se ao número de flebotomíneos com ectoparasitas, detetados quando se realiza a observação e identificação das espécies flebotomínicas, sobre o número total de flebótomos capturados, a multiplicar por cem (%).

2.2.10. Taxa de infeção por endoparasitas não *Leishmania*

A taxa de infeção por endoparasitas compreende o número de flebotomíneos com endoparasitas não *Leishmania*, detetados aquando da observação ao microscópio óptico, sobre o número total de flebótomos capturados, a multiplicar por cem (%).

2.3. Análise molecular das fêmeas flebotomínicas

2.3.1. Extração de DNA a partir de flebótomos

Para a extração de DNA genómico, a partir de flebótomos fêmeas, utilizou-se o kit comercial “CITOGENE® Cell and tissue kit - Genomic DNA Purification Kit” (Cited, Portugal), de acordo com as indicações do fabricante (Figura 2.14).

Cada flebótomo fêmea, sem a genitália, armazenado a -20°C em tubo de 1,5 ml e contendo tampão de lise, após descongelamento lento, foi submetido a um processo de

fragmentação mecânica utilizando-se “setas” de plástico esterilizadas (Sigma, EUA), até se obter uma solução homogênea do macerado. Como controle de extração, utilizou-se como amostra apenas tampão de lise permanecendo durante todo o procedimento nas mesmas condições das restantes amostras.

Adicionou-se, por amostra, 0,75 µl de Proteinase K (20mg/ml), agitando-os muito bem, seguindo-se uma incubação a 65°C durante quinze minutos, com posterior agitação dos tubos no vórtex. De seguida foi efetuada uma segunda incubação, a 55°C durante uma hora, invertendo os tubos periodicamente.

Após a incubação, seguiu-se o arrefecimento do lisado obtido à temperatura ambiente, e adicionou-se 50 µl da solução precipitadora de proteínas a cada tubo, agitando-a de seguida no vórtex durante cerca de vinte segundos. A solução foi centrifugada a 14000 rpm, durante quinze minutos, a 4°C tendo-se decantado 85 µl do sobrenadante para um novo tubo contendo 150 µl de Isopropanol a 100%, o qual foi misturado lentamente, por inversão, cinquenta vezes, seguido de nova centrifugação a 14000 rpm durante cinco minutos. Após rejeição do sobrenadante, adicionou-se a cada amostra 150 µl de etanol a 70%, e inverteu-se o tubo suavemente cerca de vinte vezes para garantir a lavagem do DNA.

Após uma última centrifugação a 14000 rpm durante dois minutos, o etanol (sobrenadante) foi rejeitado e o tubo foi colocado aberto em posição invertida sobre papel absorvente, na estufa a 52°C até que todo o líquido estivesse completamente seco. Adicionaram-se 30 µl de tampão de eluição (DNA Hydratation) por amostra, e estas foram mantidas durante a noite à temperatura ambiente. Por fim, o DNA foi armazenado a -20°C até posterior realização da técnica de PCR.

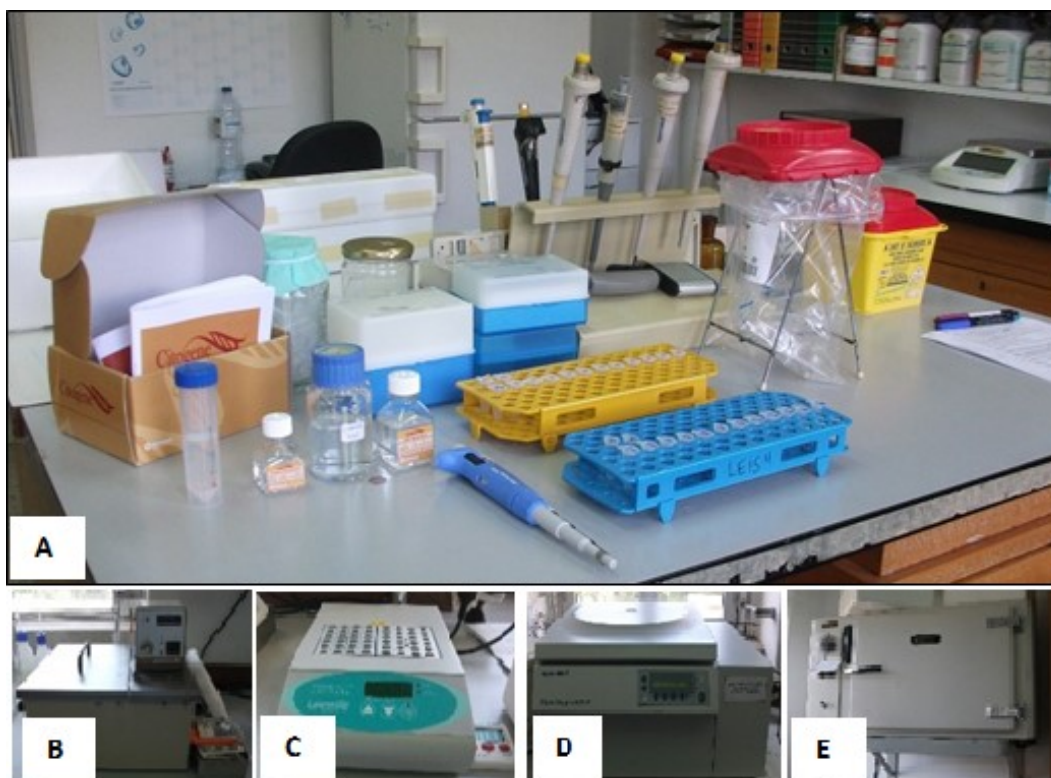


Figura 2.14: Material e Kit utilizado para a extração de DNA, a partir de flebótomos fêmeas. A- Kit; B- Banho-maria; C- Placa térmica; D- Centrífuga; E- Estufa (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

2.3.2. Detecção de DNA de *Leishmania* sp. através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após identificação morfológica dos flebotomíneos fêmeas e respetiva extração de DNA, todas as amostras foram analisadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para deteção de DNA de *Leishmania* spp.

2.3.2.1. Amplificação do DNA do cinetoplasto

Para a pesquisa de infecção por *L. infantum* nas fêmeas da espécie *P. perniciosus* foi realizada uma reação de PCR em que se utilizaram os “primers” MC1: 5’GTTAGCCGATGGTGGTCTTG3’ e MC2: 5’CACCCATTTTCCGATTTTG-3’, desenhados a partir de uma sequência completa de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *L. infantum* e específicos para espécies do complexo *L. donovani* (Cortes et al., 2014.) Esta reação de PCR com estes “primers” resulta num produto de amplificação de 447

pares de base (pb), dos quais 42 pertencem à região conservada do minicírculo e 405 pb pertencem à região favorável.

Cada reacção de PCR (volume final de 25 µl), foi constituída por: 5 µl de DNA da amostra biológica, 12,5 µl da mistura de reacção (Biomix), composta por tampão de reacção NH₄ 5x [160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCL, pH 8,8], 0,5 µl de dNTPs (10 mM) (Bioline, USA), 3 µl de Mg²⁺ (25 mM MgCL₂) e 0,2 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl) (Promega, USA), 1 µl de cada “*primer*” (MC1 e MC2, 5 pmol/µl) e 5,5 µl de água ultra pura. Como controlo positivo utilizou-se 2 µl de DNA genómico de *L. infantum* e como controlo negativo água ultra pura para substituir o DNA.

Após a preparação das misturas de reacção, estas foram colocadas no termociclador (T100™ Thermal Cycler, BioRad, Portugal), nas seguintes condições ótimas de amplificação: desnaturação inicial de dois minutos a 94°C e 30 ciclos de vinte segundos a 94°C (desnaturação), ligação a 60°C durante vinte segundos (ligação dos “*primers*”), elongação a 72°C durante trinta segundos e uma elongação final a 72°C durante cinco minutos (polimerização).

2.3.2.2. Amplificação do DNA ribossomal

Nas fêmeas de *S. minuta*, para a pesquisa de infecção por outras espécies de *Leishmania*, foram utilizados os “*primers*” do marcador molecular da região ITS-1, desenhados a partir do DNA ribossomal de *Leishmania* (rDNA), e que amplificam a sequência que separa o gene da subunidade pequena do rDNA e o gene 5.8S RNA. A sequência (300 a 350 pb) varia em tamanho e em número de nucleótidos entre as várias espécies de *Leishmania* (Figura 2.15).

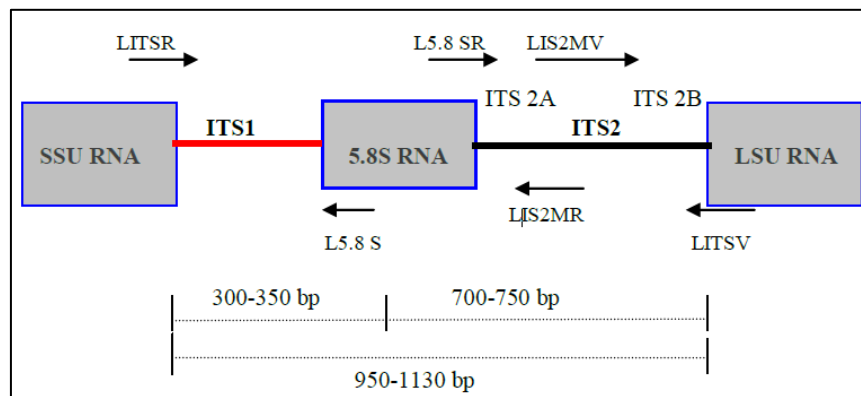


Figura 2.15: Representação esquemática do espaço interno transcrito 1 (ITS-1) no operon ribossomal amplificado com *primers* específicos de *Leishmania*.

Primers: LITSR (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') e L5.8S: (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'). SSU= pequena unidade do gene rRNA, LSU= grande subunidade do gene rRNA.

As sequências iniciadoras do marcador molecular da região ITS-1 utilizadas foram as seguintes: LITSR - (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') e L5.8S: (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3').

Preparou-se uma solução com um volume final de 25 µl, contendo 2 µl de DNA da amostra, tampão de reação NH₄ 1X [16 mM (NH₄)₂ SO₄, 67 mM tris-HCl (pH 8.8)], 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 10 pmol/µl de cada sequência iniciadora, 1U de Taq polimerase e água ultra pura para perfazer o volume final. Em todas as amplificações utilizou-se como controlo positivo DNA genómico de *L. infantum* e controlo negativo água ultra pura em substituição do DNA.

As misturas de reação foram posteriormente colocadas no termociclador Px2 Thermal Cycler que foi programado com as seguintes condições para a amplificação: desnaturação inicial a 95°C durante dois minutos, seguida por 32 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C durante vinte segundos, ligação das sequências iniciadoras a 53°C durante trinta segundos e elongação a 72°C durante um minuto) e, no final, elongação a 72°C durante seis minutos.

Todas as preparações das reações de PCR foram executadas numa área independente, de forma a evitar possíveis contaminações.

2.3.2.3. Verificação da amplificação por eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação resultantes dos dois protocolos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5%. Para a preparação deste, dissolveu-se 1,5 g de agarose pura (Citomed, Portugal), em 100 ml de tampão TAE 1X (0,04 M Tris-HCl, pH 8; 0,002 M EDTA; 0,02 M acetato de sódio) (Bio-Rad). A mistura foi levada ao forno microondas até dissolver. Seguidamente adicionou-se 3 µl de corante GreenSafe Premium (Nzytech, Portugal).

Após polimerização, o gel foi colocado na tina de eletroforese (Sub-Cell® GT, Bio-Rad) contendo tampão TAE 1X. Aplicou-se diretamente em cada poço do gel, 5 µl do produto de PCR de cada amostra e dos controlos positivo e negativo. Para determinação dos pesos moleculares dos produtos de amplificação, empregou-se também 5 µl do marcador de 100 pb NZYDNA Ladder V® (Nzytech). Através de uma fonte de alimentação (Power Pac™ 300, Bio-Rad), submeteu-se o gel a uma corrente elétrica contínua de 120 volts durante 60 minutos, permitindo assim a separação dos amplicões.

Para a visualização dos produtos de amplificação recorreu-se a um transiluminador de luz ultravioleta (MacroVue; Pharmacia LKB Biotechnology, Suécia).

2.3.3. Análise molecular das refeições sanguíneas

A análise das refeições sanguíneas das fêmeas flebotômicas capturadas foi efetuada através da realização da técnica de PCR baseada na amplificação parcial do gene do *citocromo B* mitocondrial (*cyt B*). Seguida por sequenciação dos produtos amplificados.

2.3.3.1. Amplificação do DNA do gene *citocromo b*

Para a identificação das refeições sanguíneas das fêmeas de flebótomos alimentadas, utilizaram-se as sequências iniciadoras *cyt B*1-F: 5'-CCA TCC AAC ATY TCA DCA TGA TGA AA-3' e *cyt B*2-R: 5'- GCH CCT CAG AAT GAT ATT TGK CCT CA-3' para amplificar um segmento do gene o *cyt B* do DNA mitocondrial do hospedeiro com 350 pb (Svobodová et al., 2008).

Para cada amostra preparou-se uma solução com volume final de 25 µl, contendo 5 µl de amostra e 20 µl de mistura de reação constituída por 12 µl de Biomix (BIONLINE), 0,5 pmol/ul de cada sequência iniciadora e água ultra pura para perfazer o volume final.

As condições para a amplificação por PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos seguida por 40 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto) e no final elongação a 72°C durante 7 minutos.

2.3.3.2. Verificação da amplificação por eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação obtidos foram visualizados num gel de agarose a 1,5 % como descrito anteriormente (Secção 2.3.2.3).

Na análise molecular dos flebótomos fêmeas, tanto a extração de DNA de *Leishmania* como a preparação das reações de PCR foram executados em áreas diferentes do Laboratório, de forma a evitar possíveis contaminações.

2.3.3.3. Sequenciação e análise dos segmentos de DNA

Após a visualização dos produtos amplificados, estes foram enviados para purificação e sequenciação ao serviço StabVida (Stabvida® Sequence Service, Portugal). Nesta sequenciação foram utilizados como iniciadores da sequenciação os mesmos “*primers*” utilizados nas amplificações executadas (CytB1-F/CytB2-R para análise das refeições sanguíneas). A análise das sequências obtidas foi efetuada pela Unidade de Leishmanioses do IHMT, utilizando-se o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), de nucleótidos padrão e comparadas com outras sequências homólogas no GenBank. Um nível de homologia maior ou igual a 99% foi aceite como uma identificação específica com elevado grau de confiança.

2.3.4. Determinação da taxa de infecção das espécies flebotômicas por *Leishmania* sp.

Corresponde ao número de fêmeas infetadas com *Leishmania* sobre o número total de fêmeas analisadas, a multiplicar por cem (%).

2.3.5. Determinação da proporção das diferentes fontes sanguíneas das fêmeas flebotômicas capturadas

Compreende ao número de fêmeas alimentadas em um determinado hospedeiro vertebrado a multiplicar por cem e a dividir pelo número total de fêmeas alimentadas.

2.4. Análise estatística dos dados obtidos

Utilizou-se o software *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 23.0 (SPSS®).

Para comparar o valor das densidades flebotômicas das espécies capturadas, utilizou-se um teste não-paramétrico, o teste de Wilcoxon, para amostras emparelhadas, a um nível de significância de 5%.

De modo a verificar-se a existência de associação entre a presença/ausência de determinada espécie flebotômica, em determinada variedade de biótopo prospectado, efetuou-se uma análise descritiva (tabela de contingência).

3. RESULTADOS

3.1. Espécies flebotomínicas, de ambos os sexos, capturadas e identificadas morfológicamente

Em Brejos do Assa, na estação flebotomínica estudada, capturaram-se, entre junho e novembro de 2015, no total, 68 flebótomos, 34 machos e 34 fêmeas, através da colocação de 102 armadilhas luminosas CDC, em diferentes tipos e variedades de biótopos.

Após identificação morfológica dos flebótomos de ambos os sexos, verificou-se que os exemplares pertenciam a quatro das cinco espécies assinaladas em Portugal: *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. ariasi* e *S. minuta*.

Em relação às fêmeas capturadas, a observação microscópica das espermatecas permitiu a identificação de exemplares pertencentes a dois Géneros e a duas espécies flebotomínicas, nomeadamente *P. perniciosus* (Figura 3.1) e *S. minuta* (Figura 3.2). As fêmeas de *S. minuta* foram as que mais contribuíram para a totalidade de flebotomíneos capturados (Quadro 3.1).



Figura 3.1: Espermateca de *Phlebotomus perniciosus* observada por microscopia ótica (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)



Figura 3.2: Espermateca de *Sergentomyia minuta* observada por microscopia ótica (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

Quadro 3.1: Número e espécies de flebotomíneos, de ambos os sexos, capturados em Brejos do Assa, de junho a novembro de 2015

Espécies flebotomínicas	Machos	Fêmeas	Total
<i>P. perniciosus</i>	15	3	18
<i>P. ariasi</i>	2	0	2
<i>P. sergenti</i>	4	0	4
<i>S. minuta</i>	13	31	44
Total	34	34	68

3.1.1. Abundância relativa das espécies flebotomínicas, de ambos os sexos, capturadas em Brejos de Assa, Palmela, Setúbal, de junho a novembro de 2015

S. minuta foi a espécie mais abundante, com 64,7% (44/68) de exemplares capturados, seguindo-se *P. perniciosus* com uma abundância relativa de 26,5% (18/68), *P. sergenti* com 5,9% (4/68) e, por último, *P. ariasi* com 2,9% (2/68) (Figura 3.3). Não foram capturados *P. papatasi*.

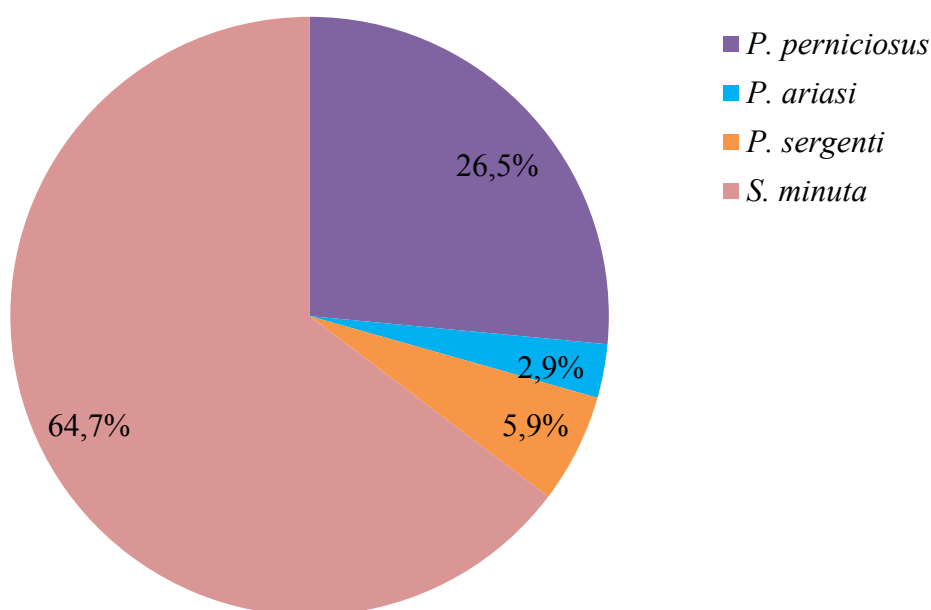


Figura 3.3: Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas de junho a novembro de 2015, Brejos do Assa, Palmela, Setúbal.

3.1.2. Fêmeas grávidas e fêmeas ingurgitadas, por espécie

Do total das fêmeas capturadas e identificadas, 17,6% (6/34) encontravam-se grávidas (observação de ovos no abdómen). Para *S. minuta* verificou-se a maior percentagem de grávidas, 14,7% (5/34), seguida de *P. perniciosus* 2,9% (1/34). As cinco *S. minuta* grávidas foram capturadas no mesmo tipo de biótopo (peridoméstico) e na mesma variedade, nomeadamente num galinheiro associado a um abrigo de pavões/interior (Figura 3.4). Duas fêmeas foram capturadas em agosto e três em setembro.

RESULTADOS

A percentagem de fêmeas ingurgitadas foi de 2,9% (1/34). A fêmea de *P. perniciosus* alimentada, foi capturada em setembro de 2015, num biótopo peridoméstico, variedade galinheiro associado a um abrigo de pavões/interior (Figura 3.4).

No que diz respeito à fêmea grávida de *P. perniciosus*, esta foi capturada em agosto, num biótopo peridoméstico, variedade galinheiro associado a curral de caprinos (Figura 3.5).



Figura 3.4: Galinheiro, junto a um lago, associado ao abrigo de pavões/interior, onde se capturaram cinco *S. minuta* grávidas e uma fêmea de *P. perniciosus* ingurgitada, Brejos do Assa (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)



Figura 3.5: Galinheiro associado a curral de cabras, onde se capturou uma fêmea grávida de *P. perniciosus*, Brejos do Assa. Assinalada a armadilha CDC (Fotografia de Rosa Miguel, 2015).

3.1.3. Razão dos sexos por espécies flebotomínicas

A razão dos sexos, para o total das espécies capturadas, foi de 1:1, um macho para uma fêmea (34/34). Para *P. perniciosus* foi de 5:1, cinco machos por fêmea (15/3) e para *S. minuta* foi de 0,42:1 (13/31) – 0,42 machos por fêmea. Nas espécies capturadas, exceto para *S. minuta*, observou-se um predomínio dos machos, sendo a diferença mais acentuada para *P. perniciosus*.

3.1.4. Grau da rotação da genitália externa dos machos: total, parcial e sem rotação

Do total de machos capturados, 5,9% (2/34) apresentaram a genitália externa parcialmente rodada. Estes corresponderam à espécie *P. perniciosus*, representando 13,3% (2/15) do total de exemplares capturados para esta espécie. Em todos os restantes, a genitália externa apresentava a rotação completa (94,1%, 32/34). Os dois machos com a genitália externa parcialmente rodada foram capturados em junho e julho de 2015. Estes foram capturados em biótopos do tipo peridoméstico, variedade galinheiro associado a coelheira/exterior e galinheiro associado a um abrigo de pavões/interior, respetivamente (Figura 3.4 e Figura 3.6).



Figura 3.6: Galinheiro associado a coelheira/exterior (A e B), onde se capturou um flebótomo macho *P. perniciosus* com a genitália externa parcialmente rodada, Brejos do Assa, Palmela, Setúbal (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

3.1.5. Taxas de infestação por ectoparasitas e por endoparasitas não *Leishmania* sp.

Durante a identificação morfológica dos flebotomíneos, não se detetou a presença de ectoparasitas nos exemplares de ambos os sexos, nem de endoparasitas não *Leishmania* sp. nas fêmeas, ao serem dissecadas para observação e identificação das espermatecas.

3.2. Distribuição das espécies flebotomínicas capturadas, por tipo e variedade de biótopos prospectados, de junho a novembro de 2015, Brejos do Assa

Na estação flebotomínica de Brejos do Assa, dos dois tipos de biótopos prospectados (domésticos e peridomésticos) e das 16 variedades dos mesmos, seis foram positivas para a presença de flebotomíneos, ou seja em 37,5 % (6/16) das variedades, capturaram-se flebótomos de ambos os sexos e de quatro espécies (Quadro 3.2).

Quadro 3.2: Tipos e variedades de biótopos prospectados (A-P) na estação de Brejos do Assa, espécies flebotomínicas e total de exemplares, de ambos os sexos, capturados, de junho a novembro de 2015

Tipos de biótopos	Variedades de biótopos	Espécies flebotomínicas e nº total de exemplares de ambos os sexos
Domésticos	A - Casa exterior: janela/jardim da habitação	1 PS ♂
	B - Casa exterior: depósito de lenha	-
	C - Casa arrecadação/interior	-
Peridomésticos	D - Galinheiro associado a coelheira/exterior	1 PN ♂
	E - Galinheiro associado a anexo de ração/interior	1 PA ♂, 2 SM ♀

F - Galinheiro associado a curral de caprinos/interior	PN 1♀ 3 ♂, 1 PA♂, 1 PS♂, 1 SM ♀ 1♂
G- Galinheiro associado a abrigo de pavões/interior	2 PN ♀ 7♂, 2 PS♂, 27 SM ♀ 10 ♂
H - Coelheira exterior	-
I - Curral de caprino/interior	-
J - Curral de ovinos/interior	-
K - Abrigo de perus/exterior	-
L - Abrigo de pavões/interior	4 PN♂, SM 2 ♀ 1♂
M - Reservatório de água/exterior	-
N - Árvore de fruto (macieira)	-
O - Árvore de fruto (nespereira)	-
P - Galinheiro vazio com ração de animais	-

PN: *P. perniciosus*, PA: *P. ariasi*, PS: *P. sergenti*, SM: *S. minuta*

3.3. Biótopos domésticos e peridomésticos: presença / ausência flebotomínica, Brejos do Assa, junho a novembro de 2015

Capturam-se flebotomíneos, de ambos os sexos, em 33,33% (1/3) nos biótopos domésticos e em 38,5% (5/13) dos biótopos peridomésticos (Figura 3.7).

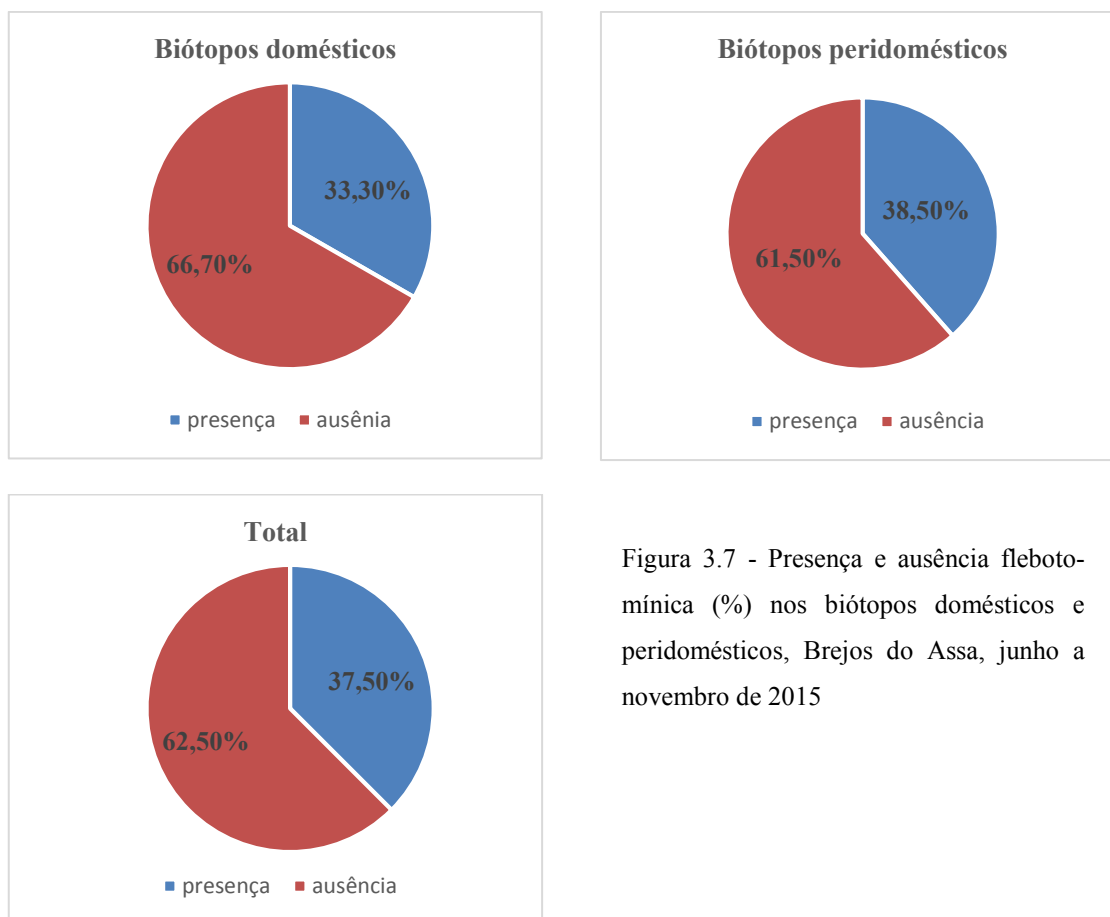


Figura 3.7 - Presença e ausência flebotomínica (%) nos biótopos domésticos e peridomésticos, Brejos do Assa, junho a novembro de 2015

3.4. Diversidade e densidade flebotomínica, por tipo e variedade de biótopos prospectados

Tal como já apresentado no Quadro 3.2, a maior diversidade de espécies, nomeadamente: *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti* e *S. minuta* foi encontrada em biótopos peridomésticos. Nos domésticos, a única espécie encontrada foi *P. sergenti* (Figura 3.8).



Figura 3.8: Parede exterior da casa (janela), onde se capturou um macho de *P. sergenti* com a genitália externa parcialmente rodada, Brejos do Assa, junho de 2015. Armadilha CDC assinalada (Fotografia de Rosa Miguel, 2015)

Dos dois tipos de biótopos prospetados, verificou-se que as maiores densidades flebotomínicas foram observadas nos biótopos peridomésticos (3.9).

A maior variedade de biótopos positivos para a presença de flebotomíneos foi encontrada em biótopos peridomésticos. Nos domésticos, apenas no biótopo casa exterior: janela/jardim da habitação se verificou a presença de flebótomos da espécie *P. sergenti* (Figura 3.9).

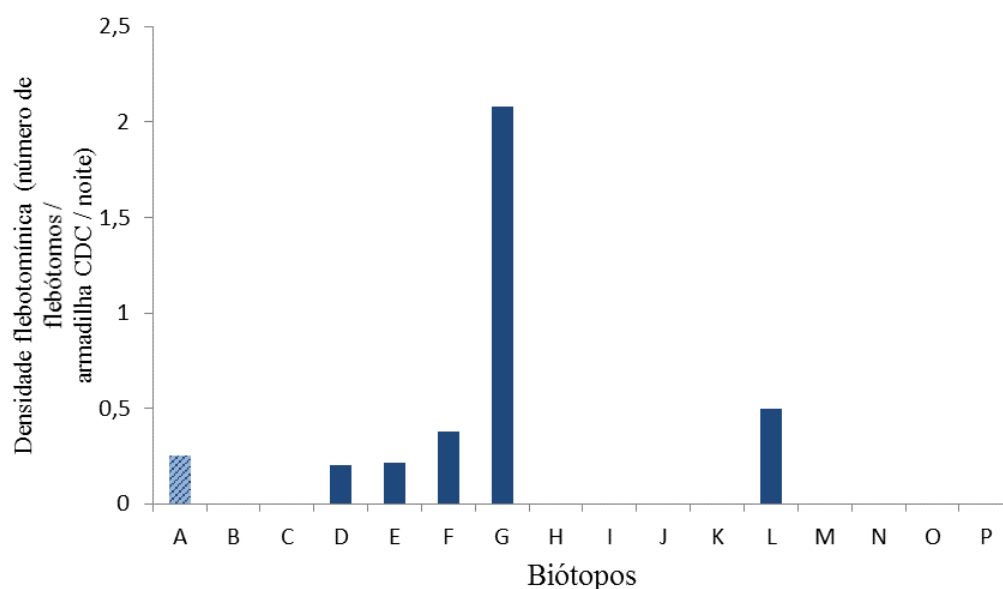


Figura 3.9: Densidade flebotomínica por tipo e variedade de biótopos, junho a novembro de 2015, Brejos do Assa, Palmela, Setúbal

RESULTADOS

A - Casa exterior: janela/jardim da habitação	I - Curral caprino interior
B - Casa exterior: depósito de lenha	J - Curral de ovinos/interior
C - Casa arrecadação/interior	K - Abrigo de perus exterior
D - Galinheiro associado a coelheira/exterior	L - Abrigo de pavões interior
E - Galinheiro associado a anexo de ração/interior	M - Reservatório de água/exterior
F - Galinheiro associado a curral de caprino/interior	N - Árvore de fruto (macieira)
G-Galinheiro associado a abrigo de pavões/interior	O - Árvore de fruto (nespereira)
H - Coelheira exterior	P - Galinheiro vazio com ração de animais

3.5. Densidade flebotomínica por espécie e por meses de captura

A densidade flebotomínica total, na estação de Brejos do Assa, de junho a novembro de 2015, foi de 0,67 (68 flebótomos/102 armadilhas CDC, noite). As maiores densidades foram observadas nos meses de agosto e setembro com 1,03 flebótomos/armadilha CDC/ noite e 1,08 flebótomos/armadilha CDC/noite, respectivamente (Figura 3.10).

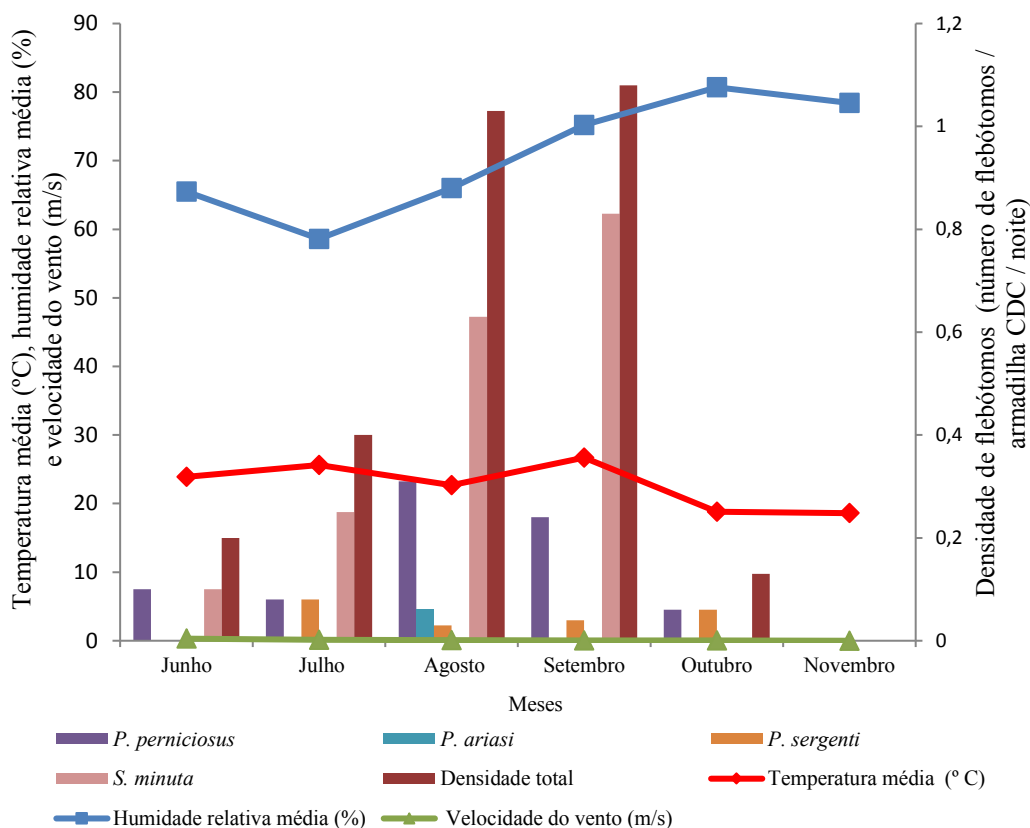


Figura 3.10 - Densidade flebotomínica, por espécies e total, de junho a novembro de 2015, em Brejos do Assa, Palmela, Setúbal

3.6. Variação sazonal das espécies flebotomínicas de junho a novembro de 2015

Setembro foi o mês em que se verificou a temperatura média mais elevada (26,7°C) enquanto a humidade relativa foi mais elevada nos meses de agosto (66%) e setembro (75,2%), em relação a julho (58,6%), que foi o mês que apresentou a humidade relativa mais baixa. A velocidade do vento foi mais baixa no período compreendido entre agosto e outubro, não ultrapassando, nos locais de captura, nos referidos meses, 0,07 m/s (agosto).

Em agosto, todas as espécies flebotomínicas morfologicamente identificadas, foram capturadas, nomeadamente *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti* e *S. minuta*. Tendo em conta a densidade flebotomínica mensal observada, a tendência, de junho a novem-

bro, foi monofásica com um pico em setembro e verificando-se, neste mês a maior densidade de *S. minuta* (Figura 3.10).

3.6.1. Densidade de *Sergentomyia minuta*, por sexo e total, de junho a novembro de 2015

A densidade flebotomínica das fêmeas de *S. minuta* aumentou de junho a setembro, não se observando o mesmo padrão com os machos (Figura 3.1). Esta espécie foi a que apresentou as maiores densidades durante o período de amostragem, com exceção do mês de outubro. A densidade de *S. minuta* apresentou uma evolução unimodal, com uma densidade máxima observada em setembro (0,83 flebótomos/armadilha CDC, noite) (Figura 3.10).

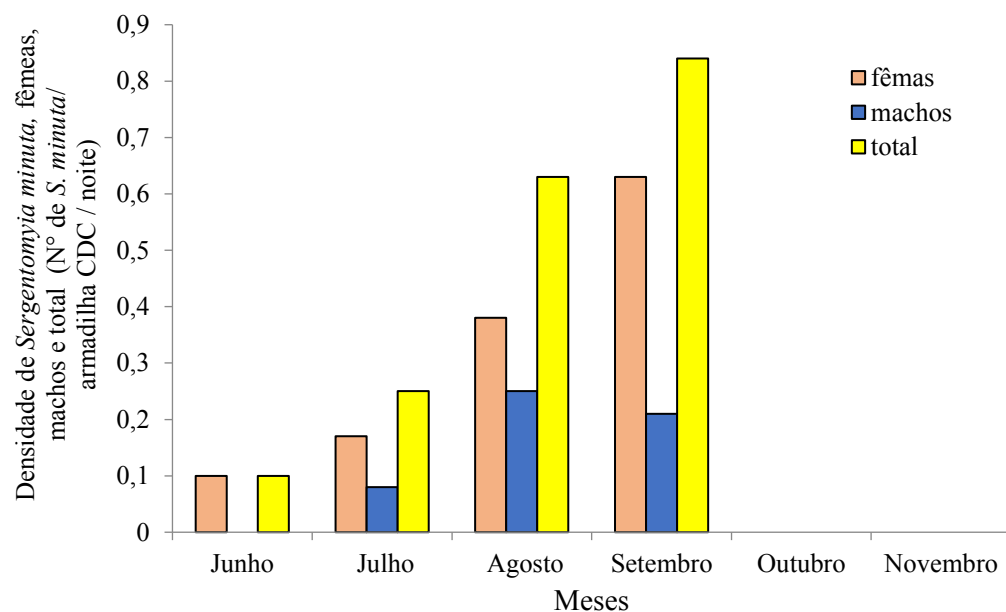


Figura 3.11: Densidade de *S. minuta*, de ambos os sexos e total, de junho a novembro de 2015, Brejos do Assa, Palmela, Setúbal

3.7. Detecção molecular de *Leishmania* sp. em flebotomíneos, capturados em Brejos do Assa, Palmela, Setúbal, 2015

Não se detetou DNA de *Leishmania* sp. em nenhuma das 34 amostras de DNA de flebótomo fêmea (Figura 3.2).

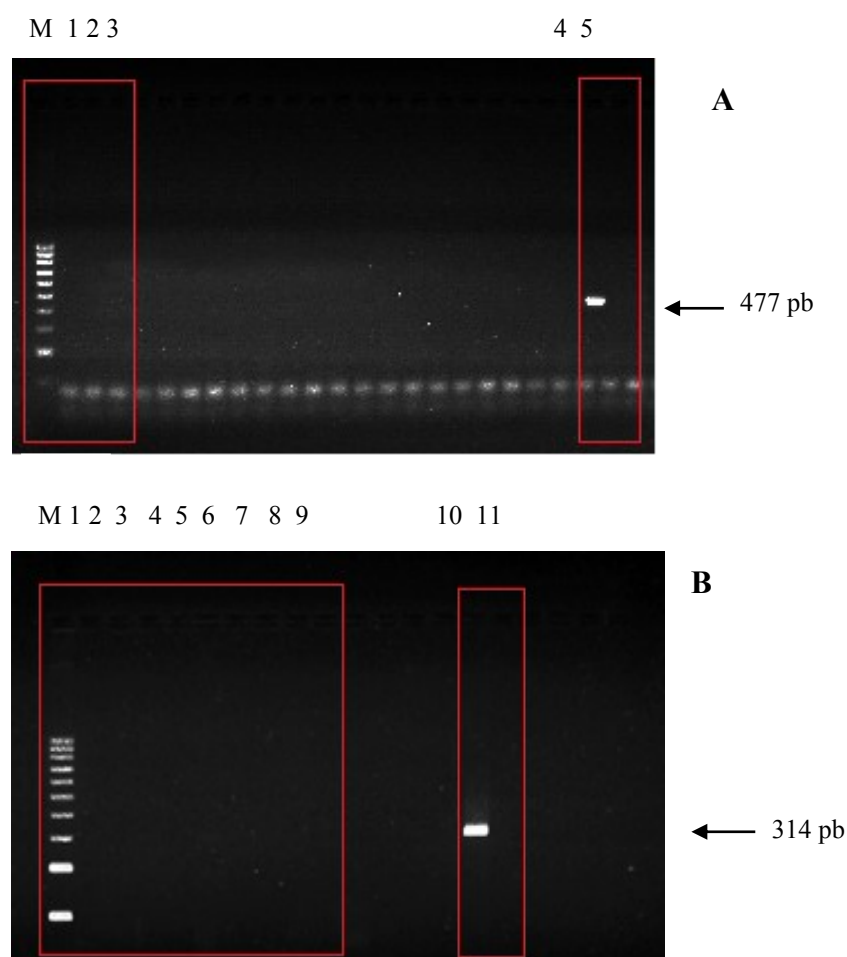


Figura 3.12: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com as sequências iniciadoras.

A - Linha 1 a 3 - produtos de PCR das amostras de DNA de fêmeas de *P. perniciosus*, linha 4 - controlo positivo, amostra de DNA de *L. infantum*, linha 5 - controlo negativo (sem DNA).

B - LITSR/L5.8S - Linha 1 a 9 - produtos de PCR das amostras de DNA de fêmeas de *S. minuta*, linha 10 - controlo positivo e linha 11 - controlo negativo (sem DNA), M - marcador de massa molecular de 100 pb (Fotografia de Rosa Miguel, 2016)

3.8. Identificação molecular das refeições sanguíneas de flebotomíneos, capturados em Brejos do Assa, Palmela, Setúbal, 2015

Das 34 fêmeas capturadas e analisadas, uma fêmea de *P. perniciosus* apresentava-se ingurgitada (com sangue no abdómen). Para este exemplar, verificou-se amplificação por PCR do segmento de cerca de 350 pb do gene - *Cyt b* de vertebrados.

Por análise comparativa das sequências do Genbank, com a sequência nucleotídica do segmento do gene - *Cyt b* amplificada, identificou-se *Gallus gallus* como sendo a fonte de alimentação sanguínea, com 99 % de homologia.

A fêmea ingurgitada foi capturada num biótopo do tipo peridoméstico, e da variedade galinheiro associado a abrigo de pavões – interior.

3.9. Análise estatística

Através do teste Shapiro-Wilk, o pressuposto da normalidade não foi validado na dimensão da Densidade PA (*P. ariasi*), uma vez que apresenta um valor de sig. ($p < 0,001$) inferior ao α (0,05).

Tests of Normality ^c						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Densidade_PN	,272	6	,186	,909	6	,427
Densidade_PA	,492	6	,000	,496	6	,000
Densidade_PS	,196	6	,200*	,929	6	,571
Densidade_SM	,225	6	,200*	,856	6	,174

Assim sendo, não se verifica a existência de uma distribuição normal para todas as espécies capturadas. Deste modo, a comparação do valor de densidades entre as espécies foi realizada, utilizando-se o teste de Wilcoxon, que permite comparar as diferenças entre medianas.

Apenas em relação à análise das medianas entre a densidade PN e a densidade PA foi possível verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre

os grupos ($p = 0,043$). Nas restantes espécies não se verificou diferenças estatisticamente significativas.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em Portugal, desde a época do eminente Cientista e Flebotomologista Doutor Carlos França, que se dedicou ao estudo dos flebotomíneos de 1912 a 1924 (Afonso et al., 2007a), tem-se efetuado estudos sobre estes insetos, como vetores de *Leishmania*, em várias regiões endémicas de leishmaniose. Contudo, e neste âmbito, tem-se verificado hiatos ao longo dos anos e, em várias áreas, desconhece-se, ou não está atualizada, a fauna flebotomínica no País. Assim, em 2015, efetuaram-se, simultaneamente, três estudos flebotomínicos em áreas distintas que, ou não tinham sido ainda estudadas, ou já o tinham sido mas há várias décadas (Vilela et al., 2016; Gouveia et al., 2016).

No concelho de Palmela, distrito de Setúbal, região endémica de Leishmaniose humana e LCan, escolheu-se uma área rural, na freguesia de Palmela, localidade de Brejos do Assa, como estação flebotomínica, em que se pudesse realizar estudos faunísticos e bioecológicos, através de capturas por armadilhas luminosas CDC. A prospeção foi realizada em diferentes tipos e variedades de biótopos, de junho a novembro do referido ano, sendo esta estação representativa duma área rural da freguesia de Palmela, que nunca tinha sido estudada anteriormente.

Num estudo flebotomínico realizado em 2002 e 2003, numa área rural pertencente ao distrito de Setúbal, mas na Arrábida, em que as capturas foram efetuadas por armadilhas CDC e aspirador elétrico manual, as maiores densidades flebotomínicas verificaram-se, por ordem decrescente, para *P. perniciosus*, *S. minuta*, *P. ariasi* e, pela primeira vez nesta região, *P. sergenti* (Afonso et al., 2005). Contrariamente, no presente estudo, as maiores densidades, e igualmente por ordem decrescente, foram para *S. minuta*, *P. perniciosus*, *P. sergenti* e, por último, *P. ariasi*. É interessante verificar que *P. ariasi* foi a espécie que apresentou menor densidade, o que pode indicar, que a estação escolhida está numa área mais árida/semiárida, ou que as condições climáticas e ambientais se modificaram ao longo destes anos, uma vez que na estação de Brejos do Assa, *P. sergenti* apresentou maior densidade em relação a *P. ariasi*, ou como não se utilizou aspirador elétrico manual, tenha havido interferência com o tipo de captura utilizado.

Uma vez que a estação flebotomínica escolhida apresentava características faunísticas e bioecológicas para a presença de quatro das cinco espécies assinaladas em

Portugal, foi interessante observar que no presente estudo, ainda que apenas se tenham utilizado armadilhas CDC, a espécie dominante foi *S. minuta*. Normalmente esta espécie apresenta maior abundância relativa quando se utilizam, como método de captura, papéis impregnados com óleo de rícino ou de castor, como se verificou num estudo efetuado por Rioux e colaboradores (2013) em França, em que *S. minuta* foi a mais abundante por m².

Também num estudo realizado em oito países do Mediterrâneo, endêmicos para *L. infantum*, incluindo Portugal (Região Metropolitana de Lisboa/Região do Algarve), entre 2011 a 2013, mas em que as capturas flebotômicas foram efetuadas na maioria dos locais, por ambos os métodos, nomeadamente armadilhas luminosas CDC e papéis impregnados, a espécie *S. minuta* apresentou maior densidade através do último método, sendo quase exclusivamente capturada por este, em mais de 90% dos locais, confirmando a baixa atratividade da luz, por esta espécie (Alten et al., 2016). No entanto, e é de reforçar, que no estudo realizado em Brejos do Assa, Palmela, apenas foram utilizadas armadilhas luminosas CDC e a espécie *S. minuta* foi a mais capturada.

É de salientar que, no que diz respeito à razão dos sexos, e contrariamente ao habitual em que se captura, por armadilha luminosa CDC, mais machos do que fêmeas (Branco, 2011) no presente trabalho, essa relação verificou-se para *P. perniciosus* mas não para *S. minuta*, em que a relação macho-fêmea foi de 0,42:1, ou seja, 0,42 machos por fêmea.

Como se capturou uma única fêmea ingurgitada (*P. perniciosus*) não foi de estranhar que esta apresentasse, como fonte alimentar *Gallus gallus*, uma vez que na estação flebotômica predominavam estes animais. Além disso, é conhecida a plasticidade trófica de *P. perniciosus*, independentemente da presença de humanos e cães.

Verificou-se que o maior número de espécies flebotômicas capturadas na mesma variedade de biótopo, correspondeu à variedade “Galinheiro associado a curral de caprinos/interior” (Quadro 3.2), em que se capturaram exemplares das quatro espécies. Já no que diz respeito ao número total de flebotómíneos capturados, a variedade correspondente a “Galinheiro associado a abrigo de pavões/interior” foi onde se capturou o maior número de exemplares. Todas as variedades de biótopos que estavam associadas a galinheiros (desde que não estivessem vazios, Quadro 3.2), foram positivas para a pre-

sença de flebotomíneos. Este facto poderá estar relacionado com a presença de muita matéria orgânica (local de postura e desenvolvimento larvar), animais como fonte de alimentação, e abrigo, uma vez que os flebotomíneos, independentemente da espécie, estavam protegidos dos eventuais ventos noturnos.

Pode-se, então, concluir que:

- Com este estudo, realizado numa área rural da freguesia de Palmela, distrito de Setúbal, e numa determinada estação flebotomínica, assinalaram-se quatro espécies das cinco existentes no País, ou seja, a única não capturada foi *P. papatasi*;
- Pelos resultados obtidos e nesta área rural, não parece haver risco de transmissão de *L. infantum*, uma vez que as densidades das espécies flebotomínicas comprovadamente vetoradas no País, são consideravelmente baixas e houve apenas um pico de eclosão de adultos;
- A existência de galinheiros, associados, ou não, à presença de outros animais, promove e aumenta a possibilidade da ocorrência de flebotomíneos e um maior aumento da captura dos mesmos.
- A predominância, neste estudo, de *S. minuta* não é de desprezar, uma vez que nesta espécie flebotomínica, já se detetou DNA de *L. major*, inclusive em Portugal (Campino et al., 2013);
- Embora se tenham obtido os referidos resultados, no que diz respeito às espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi*, dever-se-ia monitorizar esta área, para ver se posteriormente, os resultados obtidos em 2015 se mantinham, ou alteravam com eventuais fatores a serem analisados;
- Neste caso concreto, o aviso ao proprietário para melhorar as condições dos galinheiros existentes, nomeadamente a remoção da matéria orgânica com maior periodicidade, poderá baixar, ou mesmo eliminar, a presença flebotomínica. Mais uma razão para haver uma monitorização contínua.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abranches, P., Conceição-Silva, F. M., Ribeiro, M. M. S., Lopes, F. J., Gomes, L. T., 1983. Kala-azar in Portugal. IV. The wild reservoir: the isolation of *Leishmania* from a fox. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 77, 420-421.
- Afonso, M. O., & Alves-Pires, C. 2008. Capítulo 2. Bioecologia dos vectores. In: *Leishmaniose canina*, Santos, G. & Fonseca, I. P., ISBN nº 978-972-8987-16-9, Chaves Ferreira - Publicações S.A. Lisboa: 27-40.
- Afonso, M. O., Campino, L., Cortes, S. & Alves-Pires, C. 2005. The phlebotomine sandflies of Portugal. XIII- Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrábida leishmaniasis focus. *Parasite*, 12, 69-72.
- Afonso, M. O., Cardoso, L., Anastácio, S., Janz, J. G., Semião-Santos, S., Sousa, S., Rodrigues, J., Rodrigues, M. & Alves-Pires, C. 2007b. The phlebotomine sand flies of Portugal- XI. Ecology of the leishmaniosis vectors in Alijó municipality, Alto Douro region, 2001. *Acta Parasit Port*, 14, 19-22.
- Afonso, M.O., Brazil, R. & Alves-Pires, C., 2007a. Carlos França in the Science (1877-1926). *Acta Parasit Port*, 14, 23-26.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P. & Sereno, D. 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004349.
- Alexander, B. & Maroli, M. 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*, 17,1-18.
- Alexander, B., 1995. A Review of Bartonellosis in Ecuador and Colombia. *Am J Trop Med Hyg*, 52, 354-359.
- Alexander, B., 2000. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*. 14, 109-22.
- Alkan, C., Bichaud, L., Lamballerie, Xavier., Alten, B., Gould, E. A. & Charrel, R. N. 2013. Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Research*, 100, 54-74.

- Alten, B, Maia C, Afonso, MO, Campino, L, Jiménez M, González E, Molina R, Bañuls, A-L, Prudhomme J, Vergnes, B, Toty C, Cassan C, Rahola N, Thierry M, Sere-no, D, Bongiorno G, Bianchi R, Khoury C, Tsirigotakis, N, Dokianakis, E, Antoniou, M, Christodoulou, V, Mazeris, V, Karakus, M, Ozbel, Y, Arserim, SK, Kasap, OE, Gu-nay, F, Oguz, Kaynas, GS, Tsertsvadze, N, Tskhvaradze L, Giorgobiani F, Gramiccia, M, Volfl, P & Gradoni, L. 2016. Seasonal dynamics of Phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis*, 10:e0004458. DOI:10.1371/journal.pntd.0004458.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & Boer, Margriet. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7, e.0035671.
- Alves-Pires, C., Campino, L., Afonso, M. O., Santos-Gomes G., Dedet, J.-P. & Pratlong, F. 2001. Les phlébotomes du Portugal X- Infestation naturelle de *Phlebotomus perniciosus* par *Leishmania infantum* MON-1 en Algarve. *Parasite*, 8, 374-375.
- Alves-Pires, C., Santos-Gomes, G. M., Pratlong, F., Ribeiro, H., Campino, L. & Abran-ches, P., 1991. Phlébotomes du Portugal. IV. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* par *Leishmania infantum* MON-24 dans le foyer de l'Alto Douro. *Ann. Parasitol. Hum. Comp*, 66, 47-48.
- Al-Zahrani, M. A. 1988. Epidemiology of the Leishmaniasis in southwest Saudi Ara-bia. PhD thesis, London School of Hygiene & Tropical Medicine. DOI: 10.17037/PUBS.00682290. pp: 472.
- Amaro, F. I. F., 2010. *Phlebovirus*, importância em Saúde Pública em Portugal. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa:202 pp.
- Amaro, F., Ciufolini, M. G., Venturi, G., Fiorentini, C., Alves, M. J., 2007. Diagnóstico Laboratorial De Flebovírus (Vírus Toscana), 2007. *Acta Med Port*, 20, 341-345.
- Amer, M. & Amer, A., 2014. Rarely seen infections. *Clinics in Dermatology*, 32, 744-751.
- Anuário Estatístico de Palmela – Anuário Estatístico de Palmela: o retrato do concelho em números. 2013. Câmara Municipal de Palmela. pp:83.

- Azevedo, J. F., 1946. Novos dados sobre a biologia das espécies de *Phlebotomus* de Lisboa e arredores. *An Inst Med Trop*, 3, 7-20.
- Bañuls, A. L., Hide, M. & Prugnolle, F. 2007. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A parasite Genetic Update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*, 64, 1-109.
- Bari, A.U. & Rahman, S. B. 2008. Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host-parasite-vector inter-relationship. *J Pakistan Assoc Dermatol*, 18, 42-48.
- Barnes J. C., Stanley O., & Craig T. M. 1993. Diffuse cutaneous leishmaniasis in a cat. *J Am Vet Med Assoc*, 202, 416-418.
- Bates, P. A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, 37, 1097-1106.
- Bates, P. A., Depaquit, J., Galati, E. AB., Kamhawi, S., Maroli, M., McDowell, M. A., Picado, A., Ready, P. A., Salamón, D., Shaw, J. J., Traub- Csekö, Y. M. & Warburg, A. 2015. Recent advances in phlebotomine sand fly research related the leishmaniasis control. *Parasit Vectors*, 8, 131-139.
- Beniston, M., Stephenson, D. B., Christensen, O. B., Ferro, C. A. T., Frei, C., Goyette, S., Halsnaes, K., Holt, T., Jylhä, K., Koffi, B., Palutikof, J., Schöll, R., Semmler, T., & Woth, K. 2007: Future extreme events in European climate: an exploration of regional climate model projections. *Climatic Change*, 81, 71-95.
- Beran B., 2010. *Epidemiology of leishmaniasis in Southern Germany with emphasis on the family of Psychodidae, primarily Phlebotominae*. Faculty of Veterinary Medicine of th Ludwig Maximilians, University Munich, 124 pp.
- Boelaert, M. & Sundar, S. 2014. Capítulo 47. Leishmaniasis. In: *Manson's Tropical Infectious Diseases*, Farrar, J., Hotez, P., Junghanss, T., Kang, G., Lalloo, D. & White, N., ISBN nº 978-0-7020-5101-2, Saunders, Oxford: 631-651.
- Branco, S. I. 2011. *Estudo dos flebótomos (Diptera, Phlebotominae), vectores de Leishmania sp. no concelho de Torres Novas, Portugal*. Tese de Mestrado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 181 pp.

- Branco, S., Alves-Pires, C., Maia, C., Cortes, S., Cristóvão, J. M. S., Gonçalves, L., Campino, L. & Afonso, M. O. 2013. Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta Trop*, 125, 339– 348.
- Bravo-Barriga, D., Parreira, R., Maia, C., Blanco-Ciudad, J., Afonso, M. O., Frontera, E., Campino, L., Pérez-Martín, J. E., Aguilera, F.J.S. & Reina, D. 2016. First molecular detection of *Leishmania tarentolae*-like DNA in *Sergentomyia minuta* in Spain. *Parasitol Res*, 115, 1339-1344, DOI 10.1007/s00436-015-4887-z.
- Bray, D. P., Bandi, K. K., Brazil, R. P., Oliveira, A. G., & Hamilton, J. G. 2009. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to traps in the field. *J Med Entomol* 46:428-434.
- Brazil, P. R. & Brazil, G. B. 2014. Capítulo 11. Vetores na Leishmaniose Tegumentar Americana. In: *Leishmanioses do Continente Americano*. Conceição-Silva, F. & Alves, C.R., ISBN nº 978-85-7541-439-2, Fiocruz, Rio de Janeiro:193-200.
- Campino, L. & Abranches, P. 2002. Leishmaniose cutânea: Uma doença rara em Portugal? *Acta Med Port*, 15, 387-390.
- Campino, L. & Maia, C. 2010. Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Med Port*, 23, 859-64.
- Campino, L., Cortes, S., Dionísio, L., Neto, L., Afonso, M. O., Maia, C., 2013. First detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Europe. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108, 516-518.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J. A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristóvão, J. M., Afonso, M. O. & Dedet, J.P., 2006. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop.Med. Int. Health*, 11, 1708-1714.
- Canelas, V. 1999. Património Natural do Concelho de Palmela. Câmara Municipal de Palmela, ISBN nº 927-8497-03-02, 177.
- Casanova, C., Andrighetti, M.T., Sampaio, S.M., Marcoris, M.L., Colla-Jacques, F.E.&Prado, A.P. 2013. Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:

- Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in southeastern Brazil. *PLoS Neglect Tropical Dis*, 7, e2443.
- Charrel, R. N. Izri, A., Temmanm, S., Lamballerie, X., Parola, P. 2006. Toscana virus RNA in *Sergentomyia minuta* Flies. *Emerg Infect Dis*, 12, 1299-1300.
- Charrel, R.N., Bichaud, L. & de Lamballerie, X., 2012. Emergence of Toscana virus in the mediterranean area. *World journal of virology*, 1(5), pp.135–41.
- Clementi A, Battaglia G, Floris M, Castellino P, Ronco C, Cruz DN. 2011. Renal involvement in leishmaniasis: a review of the literature. *NDT Plus*, 4, 147-52.
- CMP – Câmara Municipal de Palmeia. 2016 [em linha] Disponível em: <http://www.cm-palmela.pt/pages/1571> [Consult: 22 de março de 2016].
- Cohnstaedt, L. W., Beati, L., Caceres, A. G., Ferro, C. & Munstermann, L. E., 2011. Phylogenetics of the phlebotomine sand fly group *Verrucarum* (Diptera: Psychodidae: *Lutzomyia*). *Am. J. Trop. Med Hyg*, 84, 913-922.
- Cortes, S., Afonso, M. O., Alves-Pires, C. & Campino, L. 2007. Stray Dogs and Leishmaniasis in Urban Areas, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 13, 1431-2.
- Cortes, S., Maurício, I., Kuhls, K., Nunesa, M., Lopes, C., Marcos, M., Cardoso, L., Schönián, G., & Campino, L. 2014. Genetic diversity evaluation on Portuguese *Leishmania infantum* strains by multilocus microsatellite typing. *Infection, Genetics and Evolution*, 26, 20–31.
- Costa-Durão, J. F., Rebelo, E., Peleteiro, M. C., Correia, J. J., & Simões, G. 1994. Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*): Nota preliminar, *Rev Port Cienc Vet.*, 89, 140-144.
- Cupolillo, E., Boitê, M. C. & Porrozzi, R. 2014. Capítulo 2. Considerações sobre a Taxonomia do Gênero *Leishmania*. In: *Leishmanioses do Continente Americano*. Conceição-Silva, F. & Alves, C.R., ISBN nº 978-85-7541-439-2, Fiocruz, Rio de Janeiro:34-51.
- Dawit, G., 2013. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *J Bact Parasitol*, 4, 2–7.

- Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P. E., Peyrefitte, C., 2010. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 15, 19507.
- Depaquit, J., Léger, N., Beales, P., 2006. *Chinius barbazani* n. sp. de Thaïlande (Diptera: Psychodidae). *Parasite*, 13, 151-8.
- Desjeux, P., 1992. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Statistics*, 45, 267-275.
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol, Microbiol Infect Dis*, 27, 305-318.
- DGDR - Direção Geral do Desenvolvimento Regional C.D.I. 1993. *Programa Península de Setúbal*. Coleção programas FEDER Nº7. MPAT/SEPDR.
- Ehrnst, A., Peters, C. J., Niklasson, B., Svedmyr, A. & Holmgren, B. 1985. Neurovirulent Toscana Virus (a Sandfly Fever Virus) In Swedish Man After Visit To Portugal. *The Lancet*, 325, 1212-1213.
- Ejov, M. & Dagne, D. 2014. Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014-2020. *World Health Organization*, 1-17.
- Ferrolho, J., C. Maia, C., Gomes, J, Alves-Pires, C., Cristóvão, J. M., Campino, L. & Afonso, M. O. 2015. Rotation of the external genitalia in male Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in laboratory conditions and in captured specimens in Algarve, Portugal. *Acta Trop*, 150, 1-3.
- Galati, E. A. B. 1995. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol Dir Malariol Saneam Amb*, 35 (Supl.1), 133-142.
- Galati, E. A. B. 2003. Classificação de phlebotominae. In: *Flebotomíneos do Brasil*. Rangel, E. F. & Lainson, R. Fiocruz, Rio de Janeiro: 23-51.
- Gargaté, M, J. 2014. Capítulo 3. Doenças associadas a flebótomos - Leishmaníase In: *Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores*. Nuncio, M. S., & Alves, M, J., Guide – Artes Gráficas, Lda, ISBN 978-972-8643-90-4, Lisboa, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP.

- Gebre-Michael, T., Balkew, M., Ali, A., Ludovisi, A. & Gramiccia, M. 2004. The isolation of *Leishmania tropica* and *L. aethiopica* from *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) species (Diptera: Psychodidae) in the Awash Valley, northeastern Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 98, 64-70.
- Gomes, J., Rocha, D. K., Bruno de Sousa, C., Branco, S., Alves-Pires, C. & Afonso, M. O. 2012. A produtividade de colónia de *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) de IHTM /UNL: larvas, pupas e imagos. *Acta Parasit Port*, 19, 100.
- Gouveia, S., Miguel, R., Hernandez, H., Faria, S., Alves-Pires, C., Cristovão, J. M., Maia, C., Campino, L. & Afonso, M. O. 2016. Aspetos bioecológicos de flebótomos (Diptera, Psychodidae), vetores de *Leishmania* sp., capturados em 2015, em diferentes áreas endémicas de Portugal. In: *Livro de Resumos do XVII Congresso Ibérico de Entomologia, 5 a 8 de setembro*. Lisboa, p. 65.
- Gradoni, L., & Gramiccia, M. 1994. *Leishmania infantum* tropism. Strain genotype or host immune status? *Parasitol Today*, 100, 87-267.
- Gramiccia, M., & Garndoni, L. 2007 Capítulo 5. The leishmaniasis of Southern Europe. In: *Emerging pets and vector-borne diseases in Europe*. Takken, W., & Knols, B. G. J. Wageningen Academic Publishers. 75-96.
- Guilvard, E., Rioux, J-A, Gallego, M., Pratlong, F., Mahjour, J., Martinez-Ortega, E., Dereure, J., Saddiki, A., Martini, A. 1991. *Leishmania tropica* in Morocco. III. The vector of *Phlebotomus sergenti*. Apropos of 89 isolates. *Ann Parasitol Hum Comp*, 66, 96-9.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. 2011. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology* 27:403–409.
- Hoogstraal, H., Dietlein, Dr., Heyneman, D. 1962. Leishmaniasis in the Sudan Republic. 4. Preliminary observations on man-biting sandflies (Psychodidae: Phlebotomus) in certain Upper Nile endemic Nile endemic areas. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 56:411-22.
- INE - Instituto Nacional de Estatística. 2016 [em linha] Disponível [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpgid=ine_main&xpid=INE] Consul: 15 de dezembro de 2015.

- INE - Instituto Nacional de Estatística. Censos 2011 Resultados Definitivos – Portugal. Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISSN nº 0872-6493. pp: 560.
- Kamhawi, S., 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, 22, 439-445.
- Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and controlo f phlebotomine sandflies. *Clin Dermatol*, 17, 279-289.
- Killick-Kendrick, R., Wilkes, T.J., Alexander, J., Bray, R. S., Rioux, J.A., Bailly, M. 1985. The distance of attraction of CDC light traps to phlebotomine sandfliess. *Ann Parasitol Hum Comp*, 60, 763-767.
- Lane, R. P., 1993. Sandflies (Phlebotominae). In: R.P. Lane & R.W. Crosskey, ed. *Medical Insects and Arachnids.*, Chapman & Hall, London: 78-119.
- Lane, R.P., 1991. The contribution of sandfly control to leishmaniasis control. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale*, 71 Suppl 1,65–74.
- Lawyer, P. G., & Perkins, P. V., 2000. Leishmaniasis and trypanosomiasis. In: *Medical Entomology*. 231-298
- Lawyer, P. G., Young, D. G., 1991. Diapause and quiescence in *Lutzomyia diabolica* (Diptera: Psychodidae). In: M. Maroli ed., First International Symposium on Phlebotomine Sandflies, Rome, Italy, *Parasitologia*, 33, 353-360.
- Léger, N. & Depaquit, J. 2001. Les phlebotomes et leur role dans la transmission des leishmanioses. *Rev Fr Lab*, 338, 41-8.
- Léger, N., Depaquit, J., Gay, F. 2010. *Chinius eunicegalatiae* n. sp. (Diptera; PSychodidae), a cavernicolous sandfly from Laos. *Ann Trop Med Parasitol*, 104, 595-600.
- Léger, N., Depaquit, J., Gay, F. 2012. Description of the sandfly species *Chinius samarensis* n. sp. (Psychodidae; Diptera) from the Philippines. *Pathog Glob Health*, 106, 346-351.
- Lewis D. J., Young D. G., Fairchild G. B. & D. M. Minter. 1977. Proposals for a Stable Classification of the Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology*, 2, 319-332.

- Lewis, D. H. 1975. Ultrastructural study of promastigotes of *Leishmania* from reptile. *J Protozool*, 22, 433-452.
- Lucientes, J., Castillo, J. A., Gracia, M. J. & Peribáñez, M. A., 2005. Flebotomos, de la biología al control. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, Vol. VI, 8, 1-8.
- Maia, C. & Campino, L. 2011. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, DOI:10.1016/j.pt.2011.03.008.
- Maia, C., Afonso, M. O., Freitas, F. B., Mendonça, J., Crsitóvão, J., Almeida, A. P., Campino, L. 2010. Phlebotomine sandflies vectores of in the Alqueva dam region, Portugal. *European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology* (Escaide), Lisbon, Portugal, 11 a 13 November, Abstrat Book:170.
- Maia, C., Afonso, M. O., Neto, L., Dionísio, L., Campino, L. 2009 Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. *J Vector Borne Dis*, 46, 268-272.
- Mansueto, P., Seidita, A., Vitale, G. & Cascio, A. 2014. Leishmaniasis in travelers: a literature review. *Travel Med Infect Dis*, 12, 563-581.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N. & Gradoni, L. 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical Vet Entomol*, 27, 123-47.
- Meira, M. & Ferreira, T. 1944. Espèces de Phlébotomes de Lisbonne et de ses environs. *An Inst Med Trop*, 1, 269-287.
- Millán, J., Ferroglia, E. & Solano-Gallego, L., 2014. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitol Res*, 113, 2005-2014.
- Newstead, R. 1911. On a new genus of Psyllidae from Nyasalan. *Bulletin of Entomological Research*, 2, 105-106.
- Oliveira, G. M. G., Filho, E. A. F., Andrade, G. M. C., Araújo, L. A., Oliveira, M. L. G., & Cunha, R. V. 2010. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no Município de Três Lagoas, área de transmissão intensa de leishmaniose visceral, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saúde*, 1, 83-94.

- OMS – Organização Mundial da Saúde. 2016a. [em linha] Disponível em http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Burden_distribution_VL_CL_2013.pdf?ua=1 [Consult: 22 de fevereiro de 2016].
- OMS - Organização Mundial da Saúde. 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva. In: *WHO Technical Report Series*, 949, 1-201. [consultado a 15 de abril de 2016]
- OMS - Organização Mundial da Saúde. 2015. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases, Geneva. In: *Third WHO report on NTDs*, 1-211. [consultado a 18 de junho de 2016]
- OMS - Organização Mundial da Saúde. 2016b. Leishmaniasis. [em linha] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> [Consult: 16 de maio de 2016].
- OnLeish - Observatório Nacional das Leishmanioses, 2016. [online] Disponível em <http://www.onleish.org/index.php> (Visitado a 23 de Agosto, 2016).
- Pace, D. 2014. Leishmaniasis. *J Infect*, 69 (Suppl 1), S10-18.
- Pigott, D. M., Bhatt, S., Golding, N., Duda, K. A., Battle, K. E., Brady, O. J., Messina J. P., Balard, Y., Bastien, P., Pratlong, F., Brownstein, J. S., Freifeld, C. C., Mekaru, S. R., Gething, P. W., George, D. B., Myers, M. F., Reithinger, R. & Hay, S. I. 2014. Global distribution maps of the Leishmaniasis. *eLife*, 10, e02851.
- Pina. – Estuário do Sado: reserva natural da Costa Azul. 1995, – Tur. [s.n.], 1, 20-21
- Pires, C. A. 1979. Contribuição ao conhecimento da distribuição e bioecologia dos flebótomos em Portugal (Diptera, Psychodidae). *Bolm Soc Port Ciênc Nat*, 19, 197-210.
- Pires, C. A. 1984. Les phlébotomes du Portugal I- Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, par *Leishmania* dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Ann Parasitol Hum Comp*, 59, 521-4.
- Pires, C. A. 2000. *Os flebótomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de leishmaniose em Portugal*. Tese de Doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 228 pp.

- Portugal Comissão Nacional do Ambiente – Atlas do Ambiente: Carta Ecológica: fito-edafo-climática (1:000 000). – [s.l.], 1982
- Ramalho-Ortigão, M., Saraiva, E. M. & Traub-Csekö, Y. M. 2010. Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. *Open Parasitol J*, 4, 195-204.
- Ready, P. D., 2011. Should sandfly taxonomy predict vectorial and ecological traits? *J. Vector Ecol.* 36, 17-32.
- Ready, P. D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Ann Rev of Entomol* ,58, 227-250.
- Ready, P. D., 2014. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, 6, 147-154.
- Rioux, J-A., Carron, S., Dereure, J., Périères, J., Zeraia, L., Franquet, E., Babinot, M., Gállego, M. & Prudhomme, J. 2013. Ecology of leishmaniasis in the South of France. 22. Reliability and representativeness of 12 *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus* and *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae) sampling stations in Vallespir (eastern French Pyrenees region), *Parasite*, 20, 34.
- Risipal, P. & Léger, N. 1998. Numerical taxonomy of Old World Phlebotomine (Diptera, Psychodidae). 2. Restatement of classification upon subgeneric morphological characters. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93, 787-798.
- Sabin, A. B., Philip, C. B. & Paul, J. R. 1944. *Phlebotomus papataci* or sandfly fever: a disease of military importance; summary of existing knowledge and preliminary report of original investigations. *JAMA*, 125, 603-606;693-699.
- Sangiorgi, B., Miranda, D. N., Oliveira, D. F., Santos, E. P., Gomes, F. R., Santos, E. O., Barral, A., Miranda, J. C., 2012. Natural breeding places for phlebotomine **sand** flies (Diptera: Psychodidae) in a semiarid region of Bahia state, Brazil. *J. Trop. Med.*
- Santos, F. D., & Miranda, P. 2006. *Alterações climáticas em Portugal: cenários, impactos e medidas de adaptação: Projecto SIAM II*. Lisboa, Gradiva.
- Santos, L., Simões, J., Costa, R., Martins, S. & Lecour, H. 2007. Toscana virus meningitis in Portugal, 2002-2005. *Euro Surveill*, 12, 126-128.

- Saraiva, L., Andrade-Filho, J. D., Silva, S. O., Andrade, A. S. R. & Melo, M. N., 2010. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 105, 1033-1039.
- Schallig, H. D. F. H. & Oskam, L. 2002. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health*.7, 641-51.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L., Muller, G. C. 2001. Sand fly feeding on noxious plants: a potential method for the control of leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 65, 300–303.
- Schmidt, J. R., Schmidt, M.L. & Said, M. I. 1971. Phlebotomus fever in Egypt. Isolation of phlebotomus fever viruses from *Phlebotomus papatasi*. *Am J Trop Med Hyg*, 20, 483-490.
- Schrey, C., Pires, C. & Macvean, D.1989. Distribution of phlebotomine sandflies and the rate their infectio with *Leishmania* promastigotes in the Algarve, Portugal. *Med Vet Entomol*, 3, 125-130.
- Schubach & Conceição-Silva. 2014. Capítulo. Estado da arte no Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. In: *Leishmanioses do Continente Americano*. Fiocruz, pp.391-412.
- Semião-Santos, S. J., Harith, A. E., Ferreira, E., Pires, C. A, Sousa, C. A. & Gusmão, R. 1995. Évora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol Res*, 81, 235-9.
- Shimabukuro, P. H. F., Tolezano, J. E. & Galati, E. A. B. 2011. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil. *Pap. Avulsos Zool*. São Paulo: 51, 399-441.
- Svobodová, M., Alten, B., Zídková, L., Dvorák, V., Hlaváčková, J., Myšková, J., Šeblová, V., Kasap, O., Belen, A., Votyčka J., Volf . 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Int J Parasitol* 39, 251-256.

- Tesh, R. B., Saidi, S., Javadian, E., Nadim, A. 1977. Studies on the epidemiology of sandfly fever in Iran. I. Virus isolates obtained from *Phlebotomus*. *Am J Trop Med Hyg*, 26, 282-287.
- Theodor, O. 1948. Classification of the Old World species of the subfamily Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of Entomological Research*. 39, 85-115.
- Tomás, & Romão. 2008. Capítulo 1. Biologia do parasita. In: *Leishmaniose Canina*. Santos, G., & Fonseca, I. P., ISBN nº 978-972-8987-16-9, Chaves Ferreira – Publicações, S.A. Lisboa: 7-26.
- Valassina, M., Cusi, M. G. & Valensin, P. E., 2003. A Mediterranean arbovirus: the Toscana virus. *Journal of neurovirology*, 9, 577–83.
- Verani, P., Ciufolini, M. G., Caciolli, S., Renzi, A., Nicoletti, L., Sabatinelli, G., Bartolozzi, D., Volpi, G., Amaducci, L., Coluzzi, M., Paci, P. & Balducci, M., 1988. Ecology of viruses isolated from sand flies in Italy and characterization of a new *Phlebovirus* (Arbia virus). *Am J Trop Med Hyg*, 38, 433-439.
- Vilela, M. L., Afonso, M. M., Costa, S. M., Costa, W. A. & Rangel, E. F. 2014. Capítulo 10. *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalps*: fatores associados ao processo de expansão e urbanização a leishmaniose visceral americana. In: *Leishmanioses do Continente Americano*. Conceição-Silva, F. & Alves, C.R., ISBN nº 978-85-7541-439-2, Fiocruz, Rio de Janeiro:183-192.
- Vilela, M. L., Rangel, E. F., Pita-Pereira, D., Pereira, T. D., Cristovão, J. M., Maia, C., Campino, L., Magalhães, M., & Afonso, M. O. 2016. Distribuição e abundância de flebotomos (Diptera, Psychodidae), vetores e *Leishmania* sp., no Distrito de Castelo Branco, Portugal. Realização do primeiro estudo flebotômico. In: *Livro de Resumos do XVII Congresso Ibérico de Entomologia, 5 a 8 de setembro*, Lisboa, p. 65.
- Wasserberg, G., Kirsch, P., & Rowton, E. D. 2014. Orientation of colonized sand flies *Phlebotomus papatasi*, *P. duboscqi*, and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to diverse honeys using a 3-chamber in-line olfactometer. *J Vector Ecol*, 39, 94-102.
- Young, D. G. & M. A. Duncan. 1994. Guide to the identification and geographical distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Inst.* 54: 881.

Yuval, B., & Warburg, A., 1989. Susceptibility of adult phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) to *Bacillus thuringiensis* var. israeliensis. *Am Trop Med Parasitol.* 83, 195-196.

Zhioua, E., Moureau, G., Chelbi, I., Ninove, L., Bichaud, L., Derbali, M., Champs, M., Cherni, S., Salez, N., Cook, S., Lamballerie, X. & Charrel, R. 2010. Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunísia. *J Gen Virol*, 91, 1275-1283.

6. ANEXOS

CAPTURA DE FLEBÓTOMOS

FICHA DE CAMPO

1- LOCALIZAÇÃO DA ESTAÇÃO FLEBOTOMÍNICA

Distrito de Setúbal.

Concelho de Palmela.

Freguesia de Palmela.

Localidade de Brejos do Assa.

Latitude N 380 56' 82.2"

Longitude W 0080 83' 77.0"

Altitude 39 m

2- BIÓTOPO Nº.....

3- NOME DO COLETOR.....

4- DATA E HORAS DE CAPTURA

- ☐ Dia.....
- ☐ Hora de colocação
- ☐ Hora de recolha.....
- ☐ Duração total de captura, em horas.....

5- MÉTODO DE CAPTURA

- ☐ Armadilha miniaturizada tipo CDC
- ☐ Aspirador elétrico manual
- ☐ Outro.....

6- ICONOGRAFIA

- ☐ Foto nº..... Data..... Hora.....

7- TIPO DE FORMAÇÃO SUPERFICIAL

- | | |
|--|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Solo arenoso | <input type="checkbox"/> Solo terroso |
| <input type="checkbox"/> Solo argiloso | <input type="checkbox"/> Outro..... |

8- CARACTERÍSTICAS FITOGEOGRÁFICAS

Tipo de vegetação predominante

- | | |
|--------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> Nespereira | <input type="checkbox"/> Tangerineira |
| <input type="checkbox"/> Pessegueiro | <input type="checkbox"/> Castanheiro |
| <input type="checkbox"/> Ameixoeira | <input type="checkbox"/> Cultura cerealífera |
| <input type="checkbox"/> Laranjeira | <input type="checkbox"/> Horta familiar (batata, abobora, cebola, couve, tomate) |
| <input type="checkbox"/> Cerejeira | <input type="checkbox"/> Pantas ornamentais |
| <input type="checkbox"/> Figueira | <input type="checkbox"/> Outros..... |
| <input type="checkbox"/> Romãzeira | |
| <input type="checkbox"/> Morangueiro | |
| <input type="checkbox"/> Diospireiro | |
| <input type="checkbox"/> Damasqueiro | |
| <input type="checkbox"/> Ginjeira | |

9- LOCAL DE CAPTURA

- ☐ Casa/exterior.....
- ☐ Casa arrecadação/interior...../exterior.....
- ☐ Galinheiro associado a coelheira/exterior
- ☐ Galinheiro associado a anexo de ração/interior.....
- ☐ Galinheiro associado a curral de caprino/interior.....
- ☐ Galinheiro associado a abrigo de pavões/interior.....
- ☐ Coelheira/exterior.....
- ☐ Curral de caprino/interior.....
- ☐ Curral de ovinos/interior.....
- ☐ Abrigo de perus/exterior.....
- ☐ Abrigo de pavões/interior.....
- ☐ Reservatório de água/exterior.....
- ☐ Árvores de fruto.....
- ☐ Outro.....

10-ANIMAIS EXISTENTES/QUANTIDADE

- | | |
|--|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Cão/nº | <input type="checkbox"/> Outros..... |
| <input type="checkbox"/> Gato/nº..... | |
| <input type="checkbox"/> Aves de capoeira/nº..... | |
| <input type="checkbox"/> Aves exóticas/nº..... | |
| <input type="checkbox"/> Coelho/nº..... | |
| <input type="checkbox"/> Gado caprino/nº..... | |
| <input type="checkbox"/> Gado ovino/nº..... | |
| <input type="checkbox"/> Roedores silváticos/nº..... | |

11- PRESENÇA DE COLEIRA INSECTICIDA EM CÃES E GATOS

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Cão/nº..... | <input type="checkbox"/> Gato/nº..... |
|--------------------------------------|---------------------------------------|

12 - HUMIDADE

Ao colocar a armadilha:

H. Relativa (com termohigrómetro).....%

H. Aparente (sem termohigrometro).....

- ☐ Seco
- ☐ Húmido
- ☐ Muito húmido

Ao retirar a armadilha:

H. Relativa (com termohigrómetro).....%

H. Aparente (sem termohigrometro).....

- ☐ Seco
- ☐ Húmido
- ☐ Muito húmido

13-TEMPERATURA

Ao colocar a armadilha:

- ☐ Com termohigrómetro.....⁰C

Ao retirar a armadilha:

- ☐ Com termohigrómetro.....⁰C

14- VENTO

Ao colocar a armadilha

- ☐ Velocidade do vento
(com anemómetro).....m/s

Ao retirar a armadilha:

- ☐ Velocidade do vento (com anemómetro)..... m/s

15- CHUVA

Ao colocar a armadilha

- ☐ Chuviscos
- ☐ Chuva forte

Ao retirar a armadilha

- ☐ Chuviscos
- ☐ Chuva forte

16- FASES DA LUA

- ☐ Quarto-Crescente
- ☐ Quarto-Minguante
- ☐ Lua Nova
- ☐ Lua Cheia

17- PRESENÇA DE FLEBÓTOMINEOS No BIÓTOPO

- ☐ Negativa
- ☐ Positiva

18- OBSERVAÇÕES

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....